

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Departamento Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



**TESIS DOCTORAL**

**La O- $\beta$ -N acetilglicosilación protéica en la hipertrofia del condrocito durante la condrogénesis y la artrosis**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jessica Andrés Bergós**

Directores

Raquel Largo Carazo  
Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y**  
**BIOMEDICINA**



**LA O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILACIÓN  
PROTEICA EN LA HIPERTROFIA DEL  
CONDROCITO DURANTE LA  
CONDROGÉNESIS Y LA ARTROSIS**

**TESIS DOCTORAL**  
**JESSICA ANDRÉS BERGÓS**

**MADRID, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y**  
**BIOMEDICINA**

**LA O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILACIÓN**  
**PROTEICA EN LA HIPERTROFIA DEL**  
**CONDROCITO DURANTE LA**  
**CONDROGÉNESIS Y LA ARTROSIS**

**TESIS DOCTORAL**

**JESSICA ANDRÉS BERGÓS**  
**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA**

**DIRECTORES: RAQUEL LARGO CARAZO Y**  
**GABRIEL HERRERO-BEAUMONT CUENCA**

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR**  
**IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIÓN  
S A N I T A R I A  
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ



Doña Raquel Largo Carazo, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid y Don Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, Doctor en Medicina y Profesor titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Doña Jessica Andrés Bergós, Licenciada en bioquímica por la Universidad de Zaragoza, ha realizado y elaborado en el Laboratorio de Patología Osteoarticular del IIS-Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 23 de Setiembre de 2013

Dra. Raquel Largo Carazo

Dr. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Doctoranda: Jessica Andrés Bergós

IIS-Fundación Jiménez Díaz. Avenida de los Reyes Católicos 2, 28040, Madrid.

## **AGRADECIMIENTOS**

*INTRODUCCIÓN:* La vocación científica siempre ha estado vinculada a la incertidumbre. Sin embargo, la decisión de iniciar una vida en la investigación, sobre todo lejos de tu casa, se llena de seguridad cuando tu familia te hace darte cuenta de que luchar por lo que quieres es el motor de tu futuro.

*OBJETIVO:* Desarrollar una carrera científica que enriquezca tu vida, y vivir una vida que enriquezca tu carrera científica.

*MATERIALES Y MÉTODOS:* Dos investigadores principales proporcionaron el entorno y los estímulos necesarios para cumplir el objetivo. La Fundación Conchita Rábago dio el soporte económico imprescindible. Una reconocida científica americana permitió el inicio de la expansión de fronteras.

*RESULTADOS:* Una directora de tesis que te enseña, confía en ti y te apoya. Un co-director que te anima y motiva continuamente. Un compañero que se convierte en amigo, que comparte inicio y fin de aventura, y te demuestra lo bien que puede llevarse lo clásico con lo moderno. Una vasca que cambia de color tu doctorado, que llega en el momento que más se la necesita, y trabaja duro para ayudarte. Una robacepillos que comparte más que ciencia contigo y te hace darte cuenta de que tus ideas científicas pueden resultar interesantes. Muchos compañeros de pipeta que corroboran que la ciencia si no se disfruta y se trabaja en equipo, no es ciencia. Vecinos de laboratorio que se convierten en tu familia neoyorkina. Amigas que te apoyan en los inicios más duros y te dan el soporte necesario para que todo esto salga adelante. Una compañera de piso y de ciencia que se convierte en un pilar fundamental y que seguirá compartiendo contigo postdoc trasatlántico. Amigos con mayúsculas que la ciencia y la FJD han dado, directa o indirectamente, a los que agradecer el que trasladar una vida entera de Zaragoza a Madrid por desarrollar una carrera, no sea ni mucho menos un sacrificio, sino un auténtico placer.

*CONCLUSIONES:* Todo el trabajo que se ha desarrollado en esta tesis no hubiera sido posible sin la gente que dentro y fuera del laboratorio, me ha apoyado para seguir adelante y trabajar duro. La ciencia nunca es singular, la ciencia siempre se escribe en plural.

## **RESUMEN**

La artrosis (OA) es la patología reumática más común en la población mayor de 65 años de edad, pudiendo afectar hasta el 70%. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la degradación del cartílago articular aunque también se producen alteraciones en otros tejidos articulares. Además, en los últimos años se ha descrito que el condrocito artrósico presenta un fenotipo hipertrófico similar al que se encuentra en la placa de crecimiento durante el desarrollo.

En esta tesis se ha estudiado el papel que el sistema de O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación (O-GlcNAc) puede tener en el desarrollo del fenotipo hipertrófico del condrocito durante la artrosis. Este tipo de modificación post-traducciona ha sido relacionado anteriormente con otras enfermedades crónicas, degenerativas y asociadas a la edad.

Hemos observado que el perfil proteómico de proteínas O-GlcNAc en el cartílago artrósico es muy diferente al del cartílago sano. En conjunto, cada tipo de cartílago presenta un aumento en la O-GlcNAc de proteínas involucradas en procesos biológicos característicos de su estado, y por tanto la O-GlcNAc se modifica en paralelo al fenotipo del condrocito. La O-GlcNAc que participa en el mantenimiento de la matriz, de la adhesión celular o del citoesqueleto del condrocito en el estado sano contrasta con los procesos de proteólisis y destrucción de la matriz que están regulados por O-GlcNAc en el cartílago OA.

Hemos demostrado, en un modelo *in vivo* en ratones que reproduce varios de los eventos celulares que tienen lugar en el condrocito artrósico, que un aumento de proteínas O-GlcNAc incrementa la altura de la zona hipertrófica de la placa de crecimiento durante la condrogénesis.

Nuestros estudios *in vitro* han revelado que la diferenciación hipertrófica del condrocito está precedida de un aumento en la cantidad de proteínas O-GlcNAc. Además, no solo esta modificación es estrictamente necesaria para desarrollar el fenotipo hipertrófico, sino que un acúmulo de proteínas O-GlcNAc es suficiente para inducir esta diferenciación.

La alteración de O-GlcNAc en el fenotipo condrocitario de la artrosis abre la puerta para elucidar nuevas dianas terapéuticas para futuros tratamientos de esta patología.

## **ABSTRACT**

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatic disease in population over 65 years and can affect up to 70%. This disease is characterized mainly by cartilage degradation but also by alterations in other joint tissues. Furthermore, in the last few years it has been described that osteoarthritic chondrocytes present a hypertrophic phenotype similar to that found in the growth plate during development.

In this work we have studied the role of the O-linked- $\beta$ -N-Acetyl-glycosylation (O-GlcNAc) system in the development of chondrocyte hypertrophic phenotype during osteoarthritis. This type of post-translational modification has been previously linked to other chronic, degenerative and age-related diseases.

We observed a very different proteomic profile of protein O- GlcNAc in healthy and osteoarthritic cartilage. Each type of cartilage appears to increase O- GlcNAc proteins involved in biological processes characteristic of its state, and thus the O- GlcNAc is modified in parallel to chondrocyte phenotype. The involvement of O- GlcNAc in matrix maintenance, cellular adhesion or chondrocyte cytoskeleton in the healthy state contrasts with the processes of proteolysis and matrix destruction which are regulated by O- GlcNAc in OA cartilage.

We have shown in a mouse model, which reproduces multiple cellular events that occur in osteoarthritic chondrocytes that an increase of protein O-GlcNAc increases the height of the hypertrophic zone in the growth plate during chondrogenesis.

Our *in vitro* studies have revealed that chondrocyte hypertrophic differentiation is preceded by an increase in the amount of protein O- GlcNAc. Moreover, not only this modification is strictly necessary to develop the hypertrophic phenotype, but an accumulation of protein O- GlcNAc is sufficient to induce this differentiation.

Alteration of O- GlcNAc proteins in chondrocyte phenotype during osteoarthritis opens the door to elucidate new targets for future treatments of this disease.

## **ABREVIATURAS**

<b>ADAMTS</b>	Disintegrina y Metaloproteasa con Motivos de Trombospondina
<b>AGEs</b>	Productos de Glicación Avanzada
<b>Agg</b>	Agregano
<b>AKT</b>	Proteína Quinasa B
<b>ALP</b>	Fosfatasa Alcalina
<b>BCA</b>	Ácido Bicinconínico
<b>BMP</b>	Proteína Morfogenética del Hueso
<b>CAMKIV</b>	Calmodulina Quinasa IV
<b>CDK1</b>	Proteína Quinasa Dependiente de Ciclina-1
<b>Col II</b>	Colágeno II
<b>Col X</b>	Colágeno X
<b>COMP</b>	Proteína Oligomérica de Matriz del Cartílago
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>Cps</b>	Cuentas por segundo
<b>CREB</b>	Elemento de Unión a Proteínas en Respuesta a Adenosin Monofosfato Cíclico
<b>Da</b>	Dalton
<b>DON</b>	6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucina
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetraacetato
<b>ERK</b>	Quinasa Regulada por Señales Extracelulares
<b>FBS</b>	Suero Bovino Fetal
<b>GABA</b>	Ácido Gamma-Aminobutírico
<b>GAGs</b>	Glicosaminoglicanos
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa
<b>GFAT</b>	Glutamina:Fructosa-6-Fosfato-Amidotransferasa-1
<b>GlcNAc</b>	N-Acetilglucosamina
<b>GLUT</b>	Transportador de Glucosa
<b>GSK3</b>	Glucógeno Sintasa Quinasa-3
<b>HBP</b>	Ruta Biosintética de las Hexosaminas
<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-Piperazineetanosulfónico



<b>HSP90</b>	Proteína de Choque Térmico 90
<b>IGF-1</b>	Factor de Crecimiento de Insulina 1
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IHH</b>	Indian Hedgehog
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 Beta
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
<b>IRS</b>	Proteínas Sustrato del Receptor de Insulina
<b>JNK</b>	Quinasa del Extremo N-Terminal de C-Jun
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de Inhibición Enzimática
<b>M</b>	Molaridad
<b>m RNA</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero
<b>MAPK</b>	Proteín-Quinasas Activadas Por Mitógenos
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>mg</b>	Miligramo
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b>Min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>MMP</b>	Metaloproteasa
<b>mPGES-1</b>	Prostaglandina-E Sintasa Microsomal-1
<b>MVs</b>	Vesículas de Matriz
<b>N-CAM</b>	Molécula de Adhesión Celular Neuronal
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B Activadas
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>OA</b>	Artrosis
<b>O-<math>\beta</math>-GlcNAc</b>	O-Beta-N-Acetilglicosilación
<b>OE</b>	Osificación Endocondral
<b>OGA</b>	N-Acetil-Beta-D-Glucosaminidasa
<b>OGT</b>	O-N-Acetilglucosamina Transferasa
<b>p/p</b>	Peso/Peso
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino

<b>PCR</b>	Reacción En Cadena de la Polimerasa
<b>P-E</b>	Penicilina-Estreptomicina
<b>PG</b>	Proteoglicanos
<b>PKC</b>	Proteína Quinasa C
<b>PMSF</b>	Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
<b>PTHr1</b>	Receptor de la Hormona Paratiroidea 1
<b>QTRAP</b>	Cuadrapolo/Trampa Lineal
<b>RAGE</b>	Receptor de Productos Finales de Glicación Avanzada
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>Runx2</b>	Factor de Transcripción 2 Relacionado con Runt
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>sPLA2</b>	Fosfolipasa Soluble A2
<b>STAT5</b>	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 5
<b>TEAB</b>	Bicarbonato Trietil Amonio
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>TGF-β</b>	Factor de Crecimiento Transformante Beta
<b>Th-G</b>	Thiamet-G
<b>TNF-α</b>	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
<b>U</b>	Unidades
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
<b>WGA</b>	Aglutinina del Germen de Trigo
<b>Wnt</b>	Proteína de integración en Virus de Tumor Mamario Murino perteneciente a la Familia de las Proteínas Sin Alas

## **ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>1.I. LA ARTROSIS</b>	5
1.I.A. El cartílago: composición y estructura	6
1.I.B. Patofisiología de la artrosis	10
<b>1.II. DIFERENCIACIÓN HIPERTRÓFICA CONDROCITARIA</b>	12
1.II.A. Similitudes entre la diferenciación hipertrófica y la artrosis	15
<b>1.III. LA GLICOSILACIÓN COMO MECANISMO DE RESPUESTA CELULAR</b>	16
1.III.A. La O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación	20
1.III.B. Relación entre O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación y fosforilación	22
1.III.C. La alteración de O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación como mecanismo patogénico	24
<b>2. OBJETIVOS</b>	27
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	29
3.I. Estudios en pacientes	30
3.II. Estudios en animales	30
3.III. Estudios en líneas celulares	31
3.IV. Análisis histológicos	32
3.V. Inmunohistoquímica	33
3.VI. Extracción de proteína total	33
3.VII. Cuantificación de proteínas	34
3.VIII. Western blot	34
3.IX. Inmunoprecipitación	35
3.X. Selección de proteínas O-GlcNAc	35
3.XI. Preparación de la muestra para análisis espectrométrico	36
3.XII. Análisis de espectrometría de masas	37
3.XIII. Identificación de proteínas mediante análisis bioinformático	37
3.XIV. Clasificación de proteínas por grupo biológico	38
3.XV. Estudios de expresión génica	38
3.XVI. Tinción Azul alcian	39
3.XVII. Estudios de zimografía	39

3.XVIII. Análisis estadístico.....	39
<b>4. <u>RESULTADOS</u></b> .....	40
<b>4.I. ESTUDIO PROTEÓMICO DIFERENCIAL DE LA O-<math>\beta</math>-N- ACETILGLICOSILACIÓN EN CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES ARTRÓICOS Y DONANTES SANOS .....</b>	<b>41</b>
4.I.A. Identificación de proteínas O- $\beta$ -N-Acetilglicosiladas en cartílago articular sano y artrósico.....	41
4.I.B. Análisis biológico diferencial de proteínas O- $\beta$ -N-Acetilglicosiladas en cartílago articular sano y artrósico .....	45
<b>4.II. INFLUENCIA DE PROTEÍNAS O-<math>\beta</math>-N-ACETILGLICOSILADAS EN LA DIFERENCIACIÓN HIPERTRÓFICA CONDROCITARIA: MODELO <i>IN</i> <i>VIVO</i> EN RATONES .....</b>	<b>47</b>
4.II.A. La acumulación O-GlcNAc aumenta la diferenciación condrocitaria en la placa de crecimiento <i>in vivo</i> .....	48
<b>4.III. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA O-<math>\beta</math>-N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA HIPERTROFIA CONDROCITARIA .....</b>	<b>54</b>
4.III.A. Estudio del perfil de expresión de genes hipertróficos en un modelo <i>in vitro</i> de diferenciación condrocitaria .....	54
4.III.B. Modulación del sistema de O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación a lo largo del proceso hipertrófico .....	56
4.III.C. Efecto de los niveles de O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación sobre el perfil hipertrófico en células ATDC5 .....	59
4.III.D. Efectos de la acumulación de proteínas O-GlcNAc sobre el remodelado de la matriz.....	63
4.III.E. Activación de rutas moleculares involucradas en hipertrofia condrocitaria por acumulación de proteínas O-GlcNAc .....	65
4.III.F. Estudio de la O-GlcNAc de una molécula activada en rutas de transducción de señal durante la hipertrofia condrocitaria .....	67

<b>5. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	69
<b>5.I. PERFIL DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS O-GLCNAC EN EL CARTÍLAGO SANO Y ARTRÓSICO</b> .....	70
<b>5.II. INFLUENCIA DE PROTEÍNAS O-GLCNAC EN LA DIFERENCIACIÓN HIPERTRÓFICA CONDROCITARIA <i>IN VIVO</i></b> .....	75
<b>5.III. MECANISMOS RELACIONADOS CON LA O-GLCNAC DE PROTEÍNAS DURANTE LA HIPERTROFIA CONDROCITARIA</b> .....	76
<b>6. <u>CONCLUSIONES</u></b> .....	81
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	84
<b>8. <u>ANEXO</u></b> .....	109

## ***1. INTRODUCCIÓN***

## **1.1. LA ARTROSIS.**

La artrosis (OA) es una enfermedad crónica degenerativa de la articulación, siendo la patología reumática más común en la población mayor de 65 años de edad, pudiendo afectar hasta el 70%. Esta alta prevalencia, sumado a que la ausencia de tratamiento eficaz hasta el momento conduce generalmente a cirugía de reemplazo, pone de manifiesto el elevadísimo coste socio-económico que produce.

La OA se caracteriza principalmente por la degradación del cartilago articular aunque también se produce un engrosamiento del hueso subcondral, una inflamación de grado variable en la membrana sinovial, se forman osteofitos, y hay una hipertrofia de la cápsula articular. El dolor y la discapacidad funcional producidos en la articulación conducen a una considerable pérdida de la calidad de vida [1–4].

La artrosis se ha descrito históricamente como una enfermedad asociada a la edad, dado que el envejecimiento del sistema musculoesquelético aumenta la susceptibilidad de desarrollar artrosis, pero no todos los adultos desarrollan artrosis ni todas las articulaciones del cuerpo están afectadas en el mismo grado. Así el envejecimiento contribuye, pero no es una causa directa de artrosis [5,6]. Otros muchos factores influyen en el desarrollo de la OA como la presencia de otras patologías articulares, la obesidad, el tabaco, el sexo o la predisposición genética [7–10].

En una primera clasificación, la artrosis puede definirse como primaria y secundaria, entendiéndose la primera como la desarrollada en articulaciones no dañadas previamente, en ausencia de un suceso desencadenante aparente y por tanto de etiología desconocida, y la segunda como la causada por una predisposición definida como anomalías anatómicas, traumatismos o desordenes inflamatorios y metabólicos. Sin embargo, la distinción entre artrosis primaria y secundaria no siempre está clara.

El amplio abanico de posibles factores desencadenantes de la artrosis ha llevado a nuestro grupo a describir una clasificación de la patología según el fenotipo expresado [11], definiendo los siguientes tres tipos de artrosis primaria: (I) de origen genético, (II) relacionada con hormonas sexuales (estrógenos) y (III) asociada a la edad y al envejecimiento celular.

La definición de estos diferentes tipos puede integrarse dentro de otros enfoques para mejorar la identificación de diferentes subtipos de OA, pero esta clasificación es altamente complicada debido a la gran heterogeneidad de factores.





**FIGURA 1.** Representación de los cambios que sufre la articulación en la artrosis.

Debido a que la OA puede producir cambios en todos los tejidos articulares, se pueden clasificar también diferentes fenotipos clínicos dependiendo de qué tejido sea el mayoritariamente dañado en un determinado momento. Estas formas clínicas son intercambiables en las primeras etapas de la enfermedad, pero más adelante, los síntomas van siendo homogéneos, conduciendo a un estado clínico que nuestro grupo ha descrito como “síndrome de artrosis común” en las etapas avanzadas de la enfermedad [12].

Por otra parte, los factores de riesgo extra-articulares como la obesidad y la sobrecarga en articulaciones juegan un papel importante en el proceso de la artrosis. Además de la sobrecarga mecánica, los niveles alterados de adipocinas también contribuyen al desarrollo de la OA en gente con sobrepeso, afectando tanto a las articulaciones que soportan peso como a las que no. De hecho, la artrosis ya se ha incluido como componente del síndrome metabólico, definiéndose como artrosis metabólica [13]. De manera similar, se ha descrito una nueva artrosis producida por un estado diabético [14]. La diversidad de fenotipos artrósicos en los pacientes, el diferente grado que muestran de la patología y la variedad de factores que contribuyen al desarrollo de la artrosis ponen de manifiesto la gran heterogeneidad de esta enfermedad. Posiblemente por este motivo, las terapias utilizadas actualmente no muestran la efectividad deseada, por lo que hasta la fecha no existe tratamiento que pueda frenar o revertir el desarrollo de la artrosis, reflejando la urgente necesidad de definir nuevas dianas terapéuticas.

### **1.I.A. EL CARTÍLAGO: COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA.**

El cartílago articular es un tejido avascular, aneuronal y alinfático que confiere al sistema esquelético propiedades como resistencia a las fuerzas de compresión y elasticidad, y que permite el deslizamiento de las superficies cubiertas por él debido al bajo coeficiente de fricción que presenta [15]. El cartílago articular está formado por un solo tipo celular, los condrocitos, y la matriz extracelular que los rodea. La composición y la estructura del cartílago explican sus propiedades biomecánicas. Es un tejido elástico y resistente, lo que explica su deformabilidad y su resistencia a la compresión. La elasticidad se explica por la hidrofilia de los proteoglicanos, que permite el movimiento de vaivén de las moléculas de agua ante cargas mecánicas cíclicas. La rigidez del sistema se mantiene por efecto de una red de fibras de colágeno de tipo II.

#### **Composición**

El cartílago está constituido por dos elementos: los condrocitos y la matriz extracelular. Las propiedades mecánicas del cartílago se deben principalmente a la integridad y la estructura de la MEC, la cual es sintetizada por los condrocitos.

#### **Condrocitos**

Los condrocitos ocupan el 10% del volumen total del cartílago, si bien la densidad celular varía según el tipo de articulación, la zona en la que se encuentran y la edad. El contenido celular es mayor en la capa superficial y el número de células disminuye con la edad del paciente [15]. Los condrocitos presentan un aparato de Golgi bien desarrollado y numerosas vesículas que muestran su gran actividad secretora. Estas células forman uno de los pocos tejidos que funcionan en hipoxia, y por este motivo poseen un escaso número de mitocondrias. Los condrocitos no migran y se multiplican poco o nada en el cartílago normal. A pesar de la relativa quiescencia del condrocito maduro, este tipo celular es capaz de responder a estímulos bioquímicos, estructurales o físicos sintetizando diferentes enzimas, factores de crecimiento, citoquinas y los diversos componentes de la MEC.

#### **Matriz extracelular**

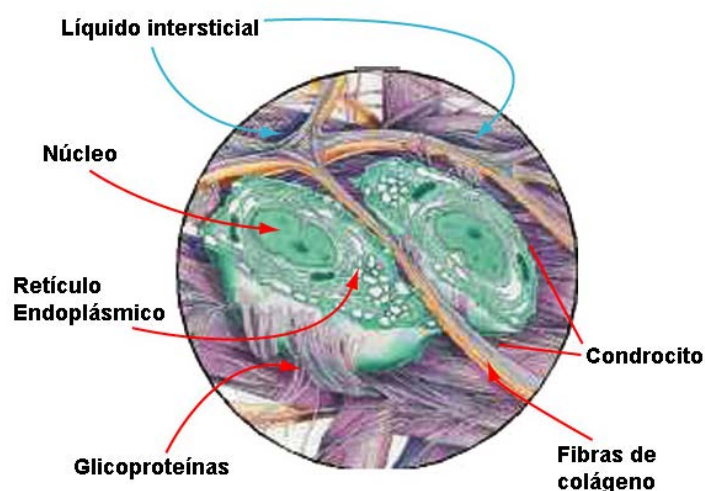
La matriz extracelular está compuesta por agua (65-80% del peso húmedo) y macromoléculas (proteínas y glucosaminoglicanos, que constituyen el 20-35% del peso húmedo del cartílago). La cantidad de agua es mayor en las capas superficiales y va disminuyendo a medida que aumenta la profundidad del cartílago. Juega un papel principal neutralizando las cargas negativas de los proteoglicanos y confiriendo elasticidad y lubricación al tejido. Dentro de las macromoléculas encontramos un 50%

de colágeno tipo II, un 35% de proteoglicanos y un 15% formado por otras proteínas. Todos esos componentes configuran las propiedades mecánicas y fisiológicas del cartílago.

### *Fibras de colágeno*

El colágeno tipo II es la proteína más abundante de la matriz del cartílago, (95% del colágeno total), y es prácticamente exclusiva de este tejido jugando un papel crucial en el mantenimiento de sus propiedades características. Si bien el único colágeno específico del cartílago es el tipo X, siendo propio del cartílago calcificado sintetizado por condrocitos hipertróficos, el de tipo II se comporta como marcador del condrocito normal y, en cultivo, indica la diferenciación del mismo. Habitualmente el colágeno de tipo II está presente como un heterodímero con colágeno del tipo IX y XI, aunque también se encuentra colágeno III y pequeñas cantidades de los tipos V, VI y X [16,17].

Cada molécula de colágeno está constituida por tres cadenas polipeptídicas alfa en forma de triple hélice. El colágeno de tipo II es sintetizado como un pre-propéptido con dominios C- y N-terminales globulares. La agregación final de procolágenos y formación de fibras requiere la eliminación de los dominios C- y N-terminal para dar el tropocolágeno. Esta escisión por las proteasas C- y N-terminal extracelulares asegura que la formación de la hélice no suceda intracelularmente. El propéptido se modifica con hidroxilación y glicosilación antes de la asociación de las cadenas y la formación de la triple hélice. La triple hélice plegada se secreta a la matriz extracelular. Los tropocolágenos se agregan después espontáneamente.



**FIGURA 2.** Disposición del condrocito y los componentes extracelulares dentro del cartílago.

Los propéptidos C- y N-terminal están presentes en mayor proporción en cartílago fetal, disminuyen rápidamente en el nacimiento, y están presentes solo en niveles muy bajos en el cartílago adulto, reflejando la baja actividad de síntesis de colágeno tipo II tras el desarrollo [18].

El diseño estructural del colágeno maduro parece ayudar a su longevidad y le proporciona un inherente grado de protección frente a la proteólisis, ya que los sitios de corte enzimático, dentro de las moléculas y entre ellas, son escasos.

En modelos animales se ha demostrado que las perturbaciones en la integridad del entramado del colágeno tipo II parecen ser un evento mucho más temprano a la evidencia histológica de pérdida de proteoglicanos [19].

### *Proteoglicanos*

Los proteoglicanos (PG) son una clase de glicoproteínas formadas por un núcleo proteico al que se encuentran unidos covalentemente glicosaminoglicanos (GAG). Estas cadenas de GAGs son largos polímeros de carbohidratos lineares que están cargados negativamente bajo condiciones fisiológicas, debido a la presencia de grupos sulfato y de grupos de ácido urónico. La mayoría de los PGs existen como grandes agregados de moléculas formadas por un núcleo central de ácido hialurónico al que se unen otros PGs de menor tamaño.

Los proteoglicanos del cartílago articular son de dos tipos: de masa molecular elevada, representados en su mayoría por el agregano; y de masa molecular reducida, representados por la decorina, el biglicano y la fibromodulina [15].

Todos estos se disponen entre las fibras de colágeno y sus propiedades biofísicas (cargas negativas), atraen las moléculas de agua que participarán en las propiedades biomecánicas del cartílago teniendo un papel decisivo en la resistencia a la compresión.

El agregano es la segunda proteína más abundante de la matriz del cartílago, representando alrededor del 90% de los proteoglicanos totales. Este proteoglicano presenta cadenas laterales de los glucosaminoglicanos condroitín y keratán sulfato.

La decorina, el biglicano y la fibromodulina tienen en común una misma estructura proteica central y sólo se diferencian por la calidad y cantidad de sus GAGs. Las moléculas pertenecen a la familia de las proteínas ricas en leucina. La decorina posee una sola cadena de condroitín sulfato (o dermatán sulfato), mientras que el biglicano posee dos. La fibromodulina, por su parte, consta de cuatro cadenas de queratán sulfato.

### *Otras proteínas*

En este grupo, se incluyen glucoproteínas y proteínas no colagenosas que participan en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la matriz extracelular y permiten las adhesiones célula-matriz [15]. Entre ellas se encuentran el biglicano, la decorina, la fibromodulina, la condroadherina y la proteína oligomérica de matriz del cartílago (COMP). La condroadherina pertenece a la familia de las proteínas ricas en leucina, al igual que la decorina, el biglicano y la fibromodulina, e intervendría, sobre todo, en procesos de interacción con integrinas y colágeno de tipo II. La tenascina, por su parte, que se expresa especialmente en la artrosis, también participaría en la modulación de la fijación del condrocito a la fibronectina. Otras son la osteonectina, las matrículas cartilaginosas y las trombospondinas.

### **Estructura**

El cartílago articular se organiza en capas que difieren entre sí según criterios bioquímicos (cantidad de proteoglicanos) y anatómicos (disposición de las fibras de colágenos, cuya red muestra una birrefringencia que varía desde la superficie hasta la profundidad). Así, podemos diferenciar cuatro zonas:

- **Zona superficial.** Constituye entre el 10 y el 20% del grosor del cartílago. Presenta una gran resistencia a la erosión ya que tiene el mayor contenido de colágeno, alrededor de un 85% del peso seco. Las fibras de colágeno se disponen orientadas de manera paralela a la superficie. El contenido en fibronectina es alto y los proteoglicanos son relativamente escasos. Los condrocitos tienen una forma alargada y plana.
- **Zona media o de transición.** Forma entre el 40 y el 50% del espesor del cartílago y contiene más proteoglicanos y menos colágeno que la zona anterior. Las fibras de colágeno se disponen de manera oblicua unas a otras. Los condrocitos adquieren una forma globular y se agrupan formando condronas. La densidad celular es la más baja de todo el cartílago.
- **Zona profunda o radial.** Forma alrededor del 40% del grosor y está formada por fibras de colágeno con el mayor diámetro, la mayor concentración de proteoglicanos y la menor cantidad de agua. Los condrocitos son más pequeños, redondeados, y están ordenados en columnas.
- **Zona calcificada.** Actúa como anclaje entre el cartílago articular y el hueso subcondral. No muestra proteoglicanos y la cantidad de colágeno desciende a

medida que nos acercamos al hueso. La concentración de calcio es elevada. Se encuentra separada de la zona anterior por el frente de calcificación.

### **1.1.B. PATOFISIOLOGÍA DE LA ARTROSIS**

El remodelado fisiológico del cartílago implica un balance entre síntesis y degradación de la matriz extracelular para mantener la homeostasis del tejido [20]. Durante la OA, este balance se rompe y conduce a cambios patológicos en la articulación afectada [21]. Aunque, como se ha mencionado, en la OA todos los tejidos de la articulación están alterados, los primeros cambios aparecen en la superficie del cartílago [22]. Los condrocitos que se encontraban quiescentes adquieren un estado activo caracterizado por la proliferación de las células, formación de agregados celulares, y un aumento de la producción tanto de proteínas de matriz, como de enzimas que degradan la matriz [23]. Aunque el balance global del metabolismo del condrocito artrósico conduce a la degradación de la matriz, se ha descrito un aumento de la síntesis y expresión génica tanto de colágeno tipo II como de agrecano en el cartílago humano artrósico en comparación con el sano [24–26]. La síntesis compensatoria inicial de colágeno tipo II parece localizarse en las zonas más profundas del cartílago artrósico [27].

La pérdida inicial de la red de colágeno así como de proteoglicanos sucede en las partes más superficiales del cartílago, siendo en este punto reversibles [21]. Con el tiempo, estos cambios se dan en zonas más internas del cartílago, y los condrocitos van perdiendo su capacidad de mantener la homeostasis, alcanzando un punto en el que no son capaces de regenerar una matriz con las mismas propiedades que la presente en el tejido sano. Así la degradación proteolítica de la matriz altera la elasticidad, la resistencia a compresión y la fuerza tensora del cartílago. Dado que los principales componentes del cartílago son el colágeno y el agrecano, las enzimas de actividad colagenasa y agrecanasa, englobadas en la familia de metaloproteasas (MMPs), juegan un papel principal en la degradación de la matriz durante la artrosis [28]. En las primeras etapas, enzimas como MMP-3 y ADMTS-5 comienzan a degradar el agrecano y a continuación se produce un aumento en la actividad de colagenasas, siendo de especial relevancia la enzima MMP13 (también colagenasa 3), que degrada el colágeno II con mayor afinidad y potencia que otras colagenasas, jugando un papel predominante en este proceso [29–31]. Otras MMPs involucradas en el desarrollo de la artrosis son las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 [32].

Los condrocitos del cartílago artrósico, además de receptores de MMPs, expresan receptores de citoquinas, quemoquinas y otras numerosas moléculas involucradas en respuestas inflamatorias y catabólicas. En la artrosis se produce una elevada concentración de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que conlleva una disminución de la síntesis tanto de colágenos como de proteoglicanos [33,34]. Además hay un incremento en la producción de prostaglandinas, el cual es mediado no solo por la inducción de la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), sino también por la prostaglandina-E sintasa microsomal-1 (mPGES-1) [35,36]. Otras moléculas como fosfolipasa soluble A2 (sPLA2), y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se producen también durante el desarrollo de la artrosis [37,38].

La activación de los condrocitos por estímulos mecánicos e inflamatorios sucede en primera instancia a través de las rutas de NF- $\kappa$ B y de las proteína-quinasa activadas por mitógenos (MAPK) [23]. La quinasa de regulación extracelular (ERK), quinasa terminal c-Jun (JNK) y p38, pertenecientes a la familia de MAPK, coordinan la inducción y activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en procesos inflamatorios y catabólicos.

La vía de señalización Wnt interviene también en la destrucción del cartílago durante la artrosis debido a que induce la hipertrofia del condrocito [39]. Los condrocitos expresan múltiples miembros de la familia Wnt [40] y la activación de la vía canónica de esta ruta a través de receptores “frizzled” que conduce a un aumento de la actividad de  $\beta$ -catenina, parece desembocar en la destrucción de la matriz.

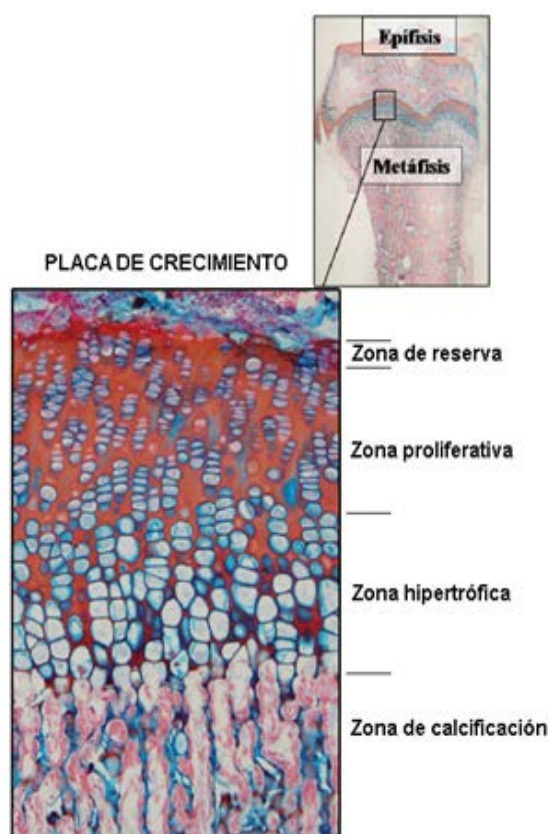
Los cambios en la expresión de genes, síntesis de proteínas y activación de rutas de señalización, han llevado a postular en los últimos años que durante la OA los condrocitos articulares inician un proceso de diferenciación semejante a los condrocitos presentes en la placa de crecimiento durante la osificación endocondral, mostrando cambios característicos del proceso de hipertrofia [41].

## **1.II. DIFERENCIACIÓN HIPERTRÓFICA CONDROCITARIA: PAPEL EN LA PLACA DE CRECIMIENTO.**

El crecimiento del esqueleto se lleva a cabo a través de la osificación endocondral (OE) en la placa de crecimiento del cartílago durante las primeras etapas de la vida [42].

La OE se inicia por la condensación y diferenciación de células mesenquimales progenitoras en condrocitos. La cascada de eventos de la diferenciación condrogénica incluye secuencialmente proliferación celular, síntesis de matriz extracelular, hipertrofia

celular, mineralización de la matriz, invasión vascular y eventualmente apoptosis, que permite el remodelado del cartílago en hueso [42]. Existen numerosas enfermedades esqueléticas causadas por disfunciones en la proliferación e hipertrofia de la diferenciación condrocitaria, así como numerosas displasias [43,44].



**FIGURA 3.** Estructura de la placa de crecimiento donde se muestran las diferentes fases por las que pasa el condrocito durante su diferenciación.

La regulación de los procesos de la OE en la placa de crecimiento (o placa endocondral) sucede a través de estrechas interacciones entre hormonas sistémicas circulantes y factores de crecimiento producidos localmente. Entre ellos, la insulina y su análogo funcional y estructural, el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-I), son fuertes estimuladores de la condrogénesis y la OE [45,46]. Ratones IGF-I null muestran una reducción en la altura de la placa de crecimiento [47]. El tratamiento con insulina ha demostrado una mejora en el crecimiento y en la cicatrización del hueso deteriorado, tanto *in vitro* como *in vivo* [46,48–50]. Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares específicos responsables de la inducción de diferenciación condrogénica mediada por insulina.



En el inicio de la OE, las células mesenquimales expresan el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y moléculas de adhesión como N-CAM y N-Cadherina, induciendo la condensación de las células [51]. El colágeno I, además de los colágenos III y V, es el mayor componente de la matriz de estas células mesenquimales no diferenciadas [52]. Mediante la señalización por proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), estas células comienzan a expresar el factor de transcripción Sox-9, el cual compromete su entrada al proceso de condrogénesis [53]. Estos condrocitos entran entonces en una fase de alta actividad proliferativa y se disponen ordenados en columnas llamadas condronas. La expresión de Sox9 parece prevenir la conversión de condrocitos proliferativos de la placa de crecimiento en condrocitos hipertróficos, presentándose así como un marcador mayoritariamente específico de proliferación [54]. Después de la diferenciación inicial a condrocitos, las células dejan de producir colágenos I, III y V y empiezan a sintetizar componentes característicos del cartílago, incluidos colágenos II, IX y XI, así como agregano [51].

Más tarde, los condrocitos van entrando en una fase de transición entre proliferación e hipertrofia, conocida como fase prehipertrófica, y empiezan a secretar Indian hedgehog (Ihh), el cual a través de su receptor patched 1 (Ptch1), induce la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea PthrP y su receptor asociado PTHR [55]. Aunque Ihh incrementa la proliferación de condrocitos no hipertróficos [56], tanto Ihh, como el eje PthrP/PTHR continúan expresándose más adelante, teniendo un papel clave en la coordinación entre proliferación y diferenciación, siendo ambas moléculas necesarias para la correcta regulación de la hipertrofia de la célula [55,57,58].

La hipertrofia condrocitaria se caracteriza por un incremento de diez veces en el volumen celular [59], el remodelado de la matriz extracelular y la expresión de marcadores de diferenciación terminal que incluyen “run-related transcription factor 2” (Runx2), metaloproteasa de matriz 13 (MMP13), colágeno X (Col X), y fosfatasa alcalina (ALP) [60]. El factor de transcripción Runx2 conduce la expresión de otros marcadores de diferenciación, incluidos MMP-13 [61], colágeno X [62–64], Ihh [65] y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [66]. La MMP-13 secretada degrada con una alta afinidad el Col II, componente clave de la matriz extracelular formada anteriormente [67][68]. El colágeno X es depositado dentro de la MEC hipertrófica y sirve como estructura para la consecuente calcificación [69].

Otras moléculas, como los miembros de la familia Wnt, están involucradas en diferentes etapas de la OE. Durante la condensación mesenquimal, la señalización por vía Wnt

previene la diferenciación condrogénica, pero en las últimas etapas, la señalización a través de la vías canónica Wnt/ $\beta$ -catenina es indispensable para la maduración del condrocito. La señalización por  $\beta$ -catenina actúa como un regulador positivo de la hipertrofia condrocitaria y la consecuente osificación [42].

La calcificación de la ECM del cartílago se origina en las vesículas de matriz (MVs) que contienen ALP, las cuales son secretadas por los condrocitos en respuesta al incremento de concentración de calcio [70] y se anclan a la matriz de Col X [69]. En la primera etapa de la mineralización, ALP hidroliza pirofosfato ( $PP_i$ ) a fosfato ( $PO_4^{3-}$ ), el cual en presencia de calcio, da lugar a la formación de hidroxiapatita dentro de las MVs [71,72]. El flujo de calcio hacia las vesículas está regulado por anexina II, V y VI, siendo la actividad de la anexina V directamente estimulada por unión a las fibras de colágeno II y X [73].

Las etapas finales de la osificación endocondral, incluida la degradación de la matriz calcificada, la invasión vascular mediada por VEGF, y la deposición de osteoblastos en trabéculas calcificadas, están bajo control de diferentes MMPs [74].

Los condrocitos hipertróficos pasan por una etapa transitoria de autofagia para ayudar a las necesidades energéticas de las células [75] antes de sufrir apoptosis y ser eliminados de la placa de crecimiento [76].

### **1.II.A. SIMILITUDES ENTRE LA DIFERENCIACIÓN HIPERTRÓFICA Y LA ARTROSIS**

El crecimiento longitudinal de los huesos depende de la proliferación y diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento hasta la hipertrofia y la formación de hueso, mientras que para la formación del cartílago articular, es fundamental que el cartílago no se diferencie hasta hueso. Tanto en el cartílago de la placa de crecimiento como en el cartílago articular podemos encontrar condrocitos en distintas etapas de diferenciación, pero la organización y actividad de los condrocitos difieren en cada etapa de ambos cartílagos [77].

Durante el desarrollo del sistema esquelético, la formación de las articulaciones se sucede por la agregación de células mesenquimales y la proliferación de los condrocitos. Sin embargo, se ha propuesto que el primer paso para la formación de la

articulación es que se inhiba la diferenciación de los condrocitos prehipertróficos en las células que se ubican en la región de la futura articulación. Éstas quedan fuera de la influencia de señales que promueven la maduración del cartílago, mientras que las células vecinas continúan su proceso de diferenciación hasta la hipertrofia y posteriormente forman hueso por osificación endocondral [78].

Los condrocitos articulares permanecen con un fenotipo “en reposo”, bloqueándose en ese estado para no sufrir diferenciación terminal. Sin embargo, en el estado patológico de la artrosis, los condrocitos articulares pierden su fenotipo y entran en una cascada de proliferación [79] y diferenciación hipertrófica similar a la que sucede durante la OE, acompañada de la expresión de marcadores de hipertrofia característicos como ALP [80], Colágeno X [81] y MMP-13 [82], con la consecuente muerte apoptótica [83] y mineralización del cartílago artrósico [84].

Varias moléculas de señalización involucradas en la proliferación y diferenciación hipertrófica del condrocito durante la osificación endocondral juegan también un papel fundamental en la degradación del cartílago articular durante la artrosis.

La señalización por la vía canónica de Wnt a través de  $\beta$ -catenina determina el destino condrogénico de las células mesenquimales progenitoras en las etapas más tempranas [85] y promueve la diferenciación hipertrófica del condrocito en las etapas finales de la OE [86]. Además, la señalización por  $\beta$ -catenina es estrictamente controlada en la regulación de la homeostasis del cartílago articular. La activación o inactivación de  $\beta$ -catenina en condrocitos articulares conllevan un fenotipo similar al artrósico [87][88].

Moléculas implicadas en la OE como BMPs, o Ihh regulan también la diferenciación condrocitaria y el remodelado de la matriz en el cartílago artrósico. Aunque BMP-2 tiene potentes efectos anabólicos, se ha mostrado que en células de condrosarcoma y en condrocitos murinos la actividad de la BMP-2 induce cambios característicos de OA a través de la estimulación de MMP-13 [89], favoreciendo directamente la pérdida del cartílago. Tanto en muestras de cartílago artrósico humano, como en cartílago articular de ratón tras OA inducida por cirugía, se ha encontrado un incremento en la expresión de genes diana de moléculas “hedgehog”. Este aumento se ha correlacionado con etapas avanzadas de la enfermedad, describiéndose la estimulación de la expresión de ADAMTS-5 a través del factor de transcripción Runx2 por parte de moléculas hedgehog [90]. Por otra parte, se ha encontrado menos erosión en el cartílago articular de ratones deficientes en MMP-13 en los que se indujo OA por cirugía, pero la hipertrofia condrocitaria y la formación de osteofitos en estos ratones no resultaban

disminuidas. Este hecho sugiere que la hipertrofia condrocitaria está acompañada, pero no directamente regulada, por MMP-13 [91].

Por otra parte, la deficiencia de Runx2 en ratones con OA inducida por cirugía demostró tener un efecto inhibitorio en la destrucción del cartílago y la formación de osteofitos, junto con un descenso en la expresión de ColX y MMP-13, sugiriendo la contribución del factor de transcripción Runx2 en la patogénesis de la artrosis a través de la hipertrofia de los condrocitos y la ruptura de la matriz tras la desestabilización de la articulación [92].

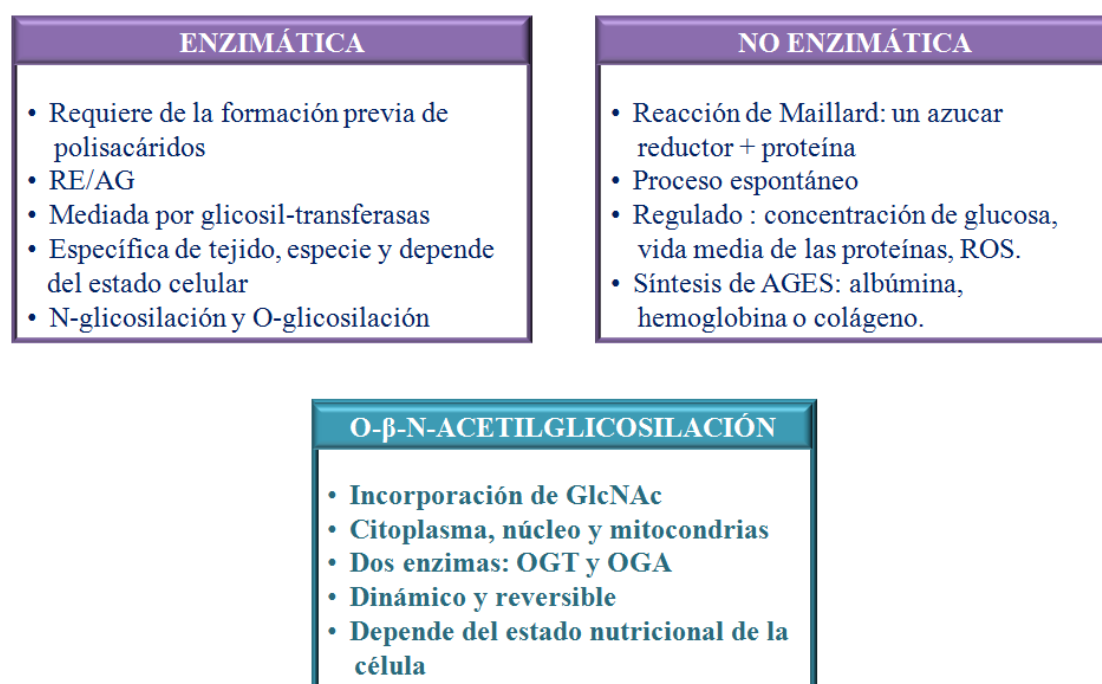
En resumen, numerosos factores involucrados en la proliferación y diferenciación condrocitaria durante la OE han mostrado tener un papel regulador en el cartílago articular durante la OA. Por tanto, la investigación con mayor detalle de los mecanismos moleculares que desencadenan el fenotipo hipertrófico en los condrocitos articulares durante la OA resultará clave para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas.

### **1.III. LA GLICOSILACIÓN COMO MECANISMO DE RESPUESTA CELULAR.**

La producción de los componentes de la matriz por parte del condrocito se lleva a cabo gracias a los nutrientes proporcionados por los tejidos adyacentes al cartílago. La glucosa es el principal sustrato energético del condrocito, aunque también aminoácidos, vitaminas y trazas de algunos minerales son esenciales para el metabolismo del cartílago. La glucosa se metaboliza básicamente por la vía de la glucólisis anaeróbica dada la condición hipóxica del tejido, y se transforma en glucosamina para la síntesis de los proteoglicanos. El transporte de glucosa al interior del condrocito depende de los transportadores GLUT 1, 3 y 9 [93], de los cuales el GLUT 1 es el más utilizado [94]; GLUT 4 solo parece ser importante durante el desarrollo de la articulación [95]. Los condrocitos sintetizan GLUT1 en función de la concentración de glucosa pero los condrocitos artrósicos expuestos a altas concentraciones de glucosa pierden la capacidad de modular la síntesis de GLUT1. Se ha sugerido que esta des-regulación puede ser un mecanismo patogénico importante por el que las condiciones diabéticas facilitan el desarrollo de la OA [96]. Así, el condrocito es susceptible a deficiencias y desequilibrios nutricionales.

La concentración de glucosa determina, entre otras cosas, la glicosilación de proteínas. La glicosilación es una modificación postraduccional fundamental para la célula, que determina la estructura, función y localización de las proteínas modificadas [97].

El estudio de la función biológica de las cadenas de azúcares que modifican proteínas y lípidos está siendo ampliamente aplicado a estudios moleculares en el campo de la biomedicina [97–100]. La glicosilación de proteínas puede clasificarse en función de si está o no mediada por enzimas.



**FIGURA 4.** Características de los diferentes tipos de glicosilación.

La glicosilación enzimática consiste en la adición de polisacáridos complejos, formados previamente, que se unen por medio de enlaces covalentes a las cadenas laterales de aminoácidos concretos. Este proceso, mediado por múltiples enzimas glicosil-transferasas específicas de tejido y especie, está muy localizada en el RE y en el aparato de Golgi [101]. La mayoría de los glicanos unidos mediante enzimas a proteínas se clasifican en dos grupos: aquellos que se unen a una asparagina a través del átomo de nitrógeno de la cadena lateral de este aminoácido (N-glicanos) y aquellos que se unen a residuos de serina o treonina (O-glicanos) [102,103]. Las glicoproteínas se encuentran en la superficie celular, en la MEC y en suero. Aunque ambos tipos de glicanos han sido analizados, la relación entre estructura y función está mejor definida en el caso de los N-

glicanos [104]. Las modificaciones de proteínas con N-glicanos contribuyen a la patogénesis de varias enfermedades [105–110]. Por ejemplo, cambios en la estructura de los N-glicanos unidos a inmunoglobulinas G (IgGs) en suero contribuye a la patogénesis de la artritis reumatoide [111–113]. En un modelo de OA en conejos se demostró que hay alteraciones en los N-glicanos del cartílago en las primeras fases de la enfermedad [114]. Un estudio demuestra que a altas concentraciones de manosa se producen más N-glicanos en condrocitos y que esto se correlaciona con la síntesis de MMP13 y ADAMTS-5 durante la degradación del cartílago [115], sugiriendo que los N-glicanos juegan un papel crucial en el inicio y progresión de la artrosis.

La glicosilación no enzimática (glicación) sucede de forma espontánea entre el grupo carbonilo libre de un azúcar y las cadenas laterales de aminoácidos de proteínas. Esta reacción es la responsable de la síntesis de productos de glicación avanzada (AGEs).

Los AGEs son moléculas muy heterogéneas en su estructura química con una tasa de degradación baja, y su acumulación en tejidos está muy relacionada con el envejecimiento y se potencia en estados diabéticos [116,117].

Se ha postulado que uno de los mecanismos por los que se desarrollan los procesos patológicos de la OA es a través de la acumulación de AGEs en las articulaciones artrósicas [6,118,119].

En diabetes se cree que los AGEs se forman como resultado de una reacción enzimática por exceso de glucosa en proteínas de la matriz extracelular de varios tejidos conectivos, incluido el cartílago articular, provocando la rigidez y la pérdida de función biomecánica de la articulación [120][121]. La estimulación de AGEs a través de su receptor RAGE puede inducir una respuesta pro-inflamatoria y el desarrollo de hipertrofia condrocitaria [122]. Los AGEs se activan por mediadores inflamatorios, pudiendo producir daño en el cartílago a través de la activación tanto de la ruta de señalización COX-2 -PGE2 como de iNOS-NO [123].

La concentración extracelular de glucosa puede modular la expresión de genes implicados en la hipertrofia condrocitaria y la OA como colágeno II y MMP13. De hecho, la exposición de condrocitos articulares a altas concentraciones de glucosa aumenta la expresión de MMP13 exclusivamente en los condrocitos artrósicos, no detectando cambios en esta expresión en condrocitos sanos [124]. La síntesis de AGEs induce la expresión de MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 y ADAMTS-5 y se ha demostrado que este proceso sucede, al menos en parte, a través de la activación de

ERK [118]. Esto demuestra que los AGEs están directamente relacionados con el proceso de destrucción del cartílago.

Además de estos dos tipos, hace treinta años se describió un tercer tipo de glicosilación de proteínas que comparte algunas características con las dos primeras. Esta nueva glicosilación, llamada O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación, es muy dinámica y reversible, está regulada únicamente por dos enzimas con funciones opuestas, y se localiza en el citoplasma, núcleo y mitocondria celular.

### **1.III.A. LA O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILACIÓN**

La incorporación de residuos de O-NAcetilglucosamina (O-GlcNAc) es el principal tipo de glicosilación encontrado dentro de los compartimentos citosólico y nuclear de células eucariotas, y constituye un mecanismo dinámico y reversible de modificación post-traducciona l de proteínas [125–130]. El monosacárido N-Acetilglucosamina (GlcNAc) se une a residuos de serina o treonina por la O-GlcNAc transferasa (OGT) [126], la cual usa UDP-GlcNAc como don or. O-GlcNAc puede ser eliminado por la O-GlcNAc-glucosaminidasa (OGA) [131].

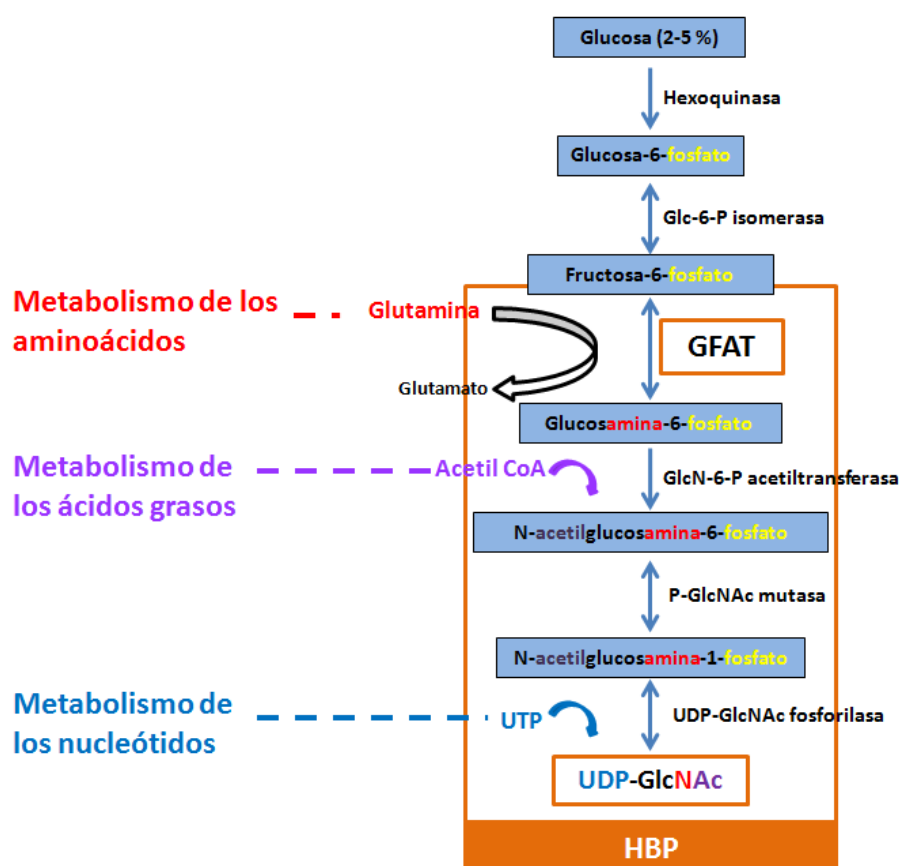
En la mayoría de las células, OGT se encuentra principalmente en el núcleo y OGA está mayoritariamente dentro del citosol. Sin embargo ambas enzimas se encuentran en múltiples componentes intracelulares, y se conoce poco sobre la regulación de su tráfico intracelular. Dentro del núcleo y particularmente en los sitios de transcripción, las dos enzimas del ciclo O-GlcNAc se encuentran habitualmente dentro del mismo complejo. Paradójicamente, aunque OGT es mayoritariamente nuclear, está excluida de los nucleolos, y OGA, presente sobretudo o en el citosol, se encuentra en altas cantidades dentro de los nucleolos [132]. Una de las isoformas de OGT se encuentra localizada en la superficie de la membrana más interna de la mitocondria [133] pero todavía no se ha descrito una isoforma mitocondrial para OGA.

Mientras la O-GlcNAc catalizada por OGT parece estar restringida a compartimentos celulares, se ha sugerido la existencia de una nueva glicosiltransferasa que cataliza la adición de O-GlcNAc a los dominios extracelulares del receptor Notch [134]. Esta llamada eOGT parece no tener ninguna homología con la OGT nucleocitoplásmica.

La concentración de UDP-GlcNAc está regulada por los niveles de glucosa y se sintetiza a través de la ruta de biosíntesis de hexosaminas (HBP) [135,136]. Esta ruta, descrita hace alrededor de 25 años [137], es una parte del metabolismo celular de la

glucosa por la que se metaboliza entre un 2-5% de la glucosa celular [138]. Esta ruta convierte fructosa 6-fosfato en UDP-N-Acetilglucosamina, necesario para la incorporación de grupos de GlcNAc mediante un enlace éster a residuos de serina y treonina (O-GlcNAc).

Dado que la síntesis de UDP-GlcNAc está afectada por prácticamente todas las rutas metabólicas de la célula y que la incorporación enzimática de este residuo es sensible a la insulina, nutrientes, y al estrés celular, se ha propuesto al sistema de O-GlcNAc como un sensor nutricional [126,127,139,140].



**FIGURA 5.** Ruta de biosíntesis de hexosaminas.

La O-GlcNAc es una modificación muy abundante que ocurre en todos los organismos superiores, y que se ha descrito para más de 400 proteínas, incluyendo factores de transcripción (NFkB, Runx2, STAT5, CREB), proteínas del citoesqueleto (caderinas, miosina, queratinas, tau, anexina II), moléculas traductoras de señal y chaperonas (HSP27, HSP70, HSP90, receptor GABA), proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa (GSK3, enolasa) y oncogenes (c-myc, p53) [127,129,130,141,142]. Esto



pone de manifiesto que la O-GlcNAc es un regulador clave de diferentes procesos celulares, incluyendo traducción de señal, transcripción y degradación proteosómica.

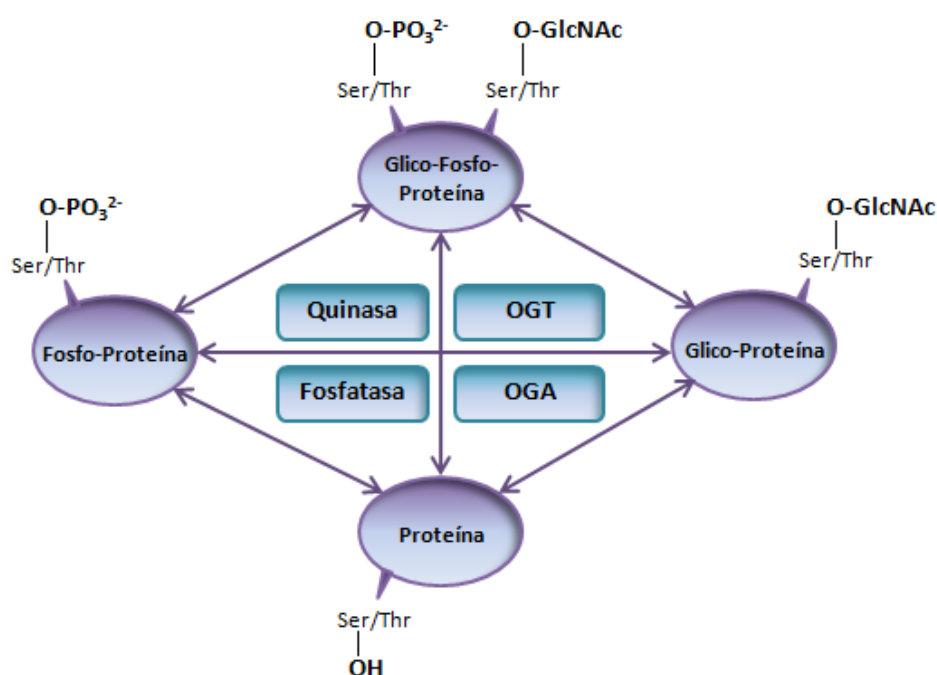
### **1.III.B. RELACIÓN ENTRE O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILACIÓN Y FOSFORILACIÓN.**

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la extensa relación que existe entre la O-GlcNAc y la fosforilación [126,143–145]. De hecho, se ha demostrado que la inhibición de una única quinasa, GSK3 $\beta$ , incrementa la O-GlcNAc de muchas proteínas (mayoritariamente del citoesqueleto y proteínas de choque térmico, Hsp), y a su vez disminuye la O-GlcNAc de muchas otras (principalmente factores de transcripción y proteínas de unión a RNA) [146]. En otro estudio se demostró que al inducir la sobreexpresión de OGT se reducía drásticamente la actividad de la proteína quinasa dependiente de ciclina-1 (CDK1), disminuyendo así la fosforilación de importantes sustratos implicados en división celular [147].

En contraste con lo que ocurre con la fosforilación, proceso en el que conocemos más de 600 fosforilasas y fosfatasas, las enzimas que catalizan la incorporación y la eliminación del grupo O-GlcNAc son únicamente dos. Sin embargo, OGT y OGA pueden compararse con el sistema de quinasas/fosfatasas si tenemos en cuenta que catalizan modificaciones postraduccionales muy dinámicas, que se dan en residuos de aminoácidos concretos y que pueden regular numerosos procesos celulares.

De hecho, los residuos de serina y treonina que se modifican por O-GlcNAc son, en muchas ocasiones, susceptibles de fosforilarse, compitiendo recíprocamente en la modificación de estos residuos [148]. Así ocurre en la proteína oncogénica c-Myc [149], el receptor de estrógenos- $\beta$  [150], algunos sitios de la polimerasa II de RNA [151][152], la óxido nítrico sintasa endotelial [153], y muchas otras. Otras proteínas son competitivamente modificadas por O-GlcNAc o fosfato en residuos próximos, pero no en el mismo residuo, como es el caso de la vimentina [154], p53 [155] o CAMKIV [156]. Esta relación no es únicamente recíproca: algunas proteínas pueden estar a la vez fosforiladas y O-GlcNAc. Se ha descrito que algunas de las moléculas que juegan un importante papel en la OA, como  $\beta$ -catenina o AKT, regulan su acción a través de la O-GlcNAc, determinando su localización celular, o interfiriendo en la fosforilación de la propia molécula [157][158]. En otras proteínas, estas dos modificaciones pueden existir simultáneamente en sitios distantes dentro de la misma molécula, como sucede en las

proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS) [159] y la cadena ligera de miosina cardiaca [160].



**FIGURA 6.** Esquema que refleja la relación entre la O-GlcNAc y fosforilación de proteínas.

OGT: O-GlcNAc transferasa; OGA: O-GlcNAc-glucosaminidasa.

De hecho, se ha descrito la asociación de fosfatasa con OGT [161], sugiriendo que el mismo complejo enzimático cataliza a la vez la eliminación del grupo fosfato y la adición del residuo de O-GlcNAc. Cada vez se conocen más quinasas que no solo son capaces de O-GlcNAcilarse, sino que además esta modificación regula su actividad, como es el caso de AKT [158,162–164] o la proteína quinasa C (PKC) [165,166]. Por otra parte, OGT se fosforila tanto en residuos de tirosina como de serina. La fosforilación por el receptor de insulina, CAMKIV y otras quinasas, activa OGT y puede intervenir en su interacción con sustratos o unidades reguladoras de especificidad [167]. OGA también puede ser fosforilada, pero las consecuencias de esta modificación no están claras [168].

### 1.III.C. LA ALTERACIÓN DE O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILACIÓN COMO MECANISMO PATOGENICO.

Dentro de las numerosas funciones biológicas en las que participa la O-GlcNAc se incluye también la respuesta al daño celular. Se ha observado que la O-GlcNAc de un gran número de proteínas aumenta rápidamente cuando las células se exponen a una situación de estrés como calor, alta concentración salina, metales pesados, luz UV, hipoxia y otros tipos [129][169]. Una alta O-GlcNAc parece contribuir a un aumento en la expresión de chaperonas y proteínas de choque térmico (HSP). Cuando se aumentan los niveles de O-GlcNAc por inhibición de OGA u otros mecanismos, la supervivencia celular a estrés tóxico aumenta sorprendentemente. Varios estudios han demostrado *in vivo* que un incremento de O-GlcNAc es protector contra estrés o trauma [170,171]. Por ejemplo, se ha visto en modelos animales que un aumento en O-GlcNAc protege al músculo cardíaco de daño tisular después de un ataque cardíaco [172–174].

En contraste con el beneficio asociado a elevaciones transitorias, las alteraciones crónicas en los niveles de O-GlcNAc se han asociado con la patogénesis de enfermedades degenerativas como el Alzheimer, el cáncer, la diabetes y sus complicaciones. En cuanto a las alteraciones en incorporación de residuos O-GlcNAc en el envejecimiento, se ha demostrado un incremento en la cantidad O-GlcNAc en el corazón, el cerebro y el músculo de ratas que se correlaciona con su edad [175].

Numerosos trabajos han establecido que la HBP y la O-GlcNAc juegan un papel fundamental en la etiología de la diabetes y la toxicidad de la glucosa [136,138,176,177]. En adipocitos se ha establecido una relación entre la conversión de glucosa a glucosamina y la resistencia a insulina producida (4) actuando en la enzima limitante de la ruta, GFAT (185-187). Por otro lado, se ha demostrado que el receptor de insulina activa OGT y de esta forma modifica con O-GlcNAc componentes de la cascada de señalización por insulina. Esto resulta en una alteración de la fosforilación de moléculas señalizadoras clave y la atenuación de la señal por esta ruta [178]. Además, las proteínas IRS se modifican por O-GlcNAc en diferentes sitios [179], y un incremento en esta modificación reduce su capacidad de unión a la subunidad p85 reguladora de la fosfoinositido-3 quinasa [167].

El hecho de que la hiperglucemia sea tan deletérea para las células y los tejidos cuando la glucosa no es una molécula tóxica, puede explicarse por desequilibrio que se produce entre O-GlcNAc y fosforilación. Además la hiper-O-GlcNAc no solo afecta a las rutas

de señalización mediadas por fosforilación, sino que también altera la regulación de la transcripción, modificando a varios factores de transcripción que conducirán a una expresión anormal de los genes diana [180–184].

Dada la importancia que el metabolismo de la glucosa tiene en el cerebro, y que después del páncreas, es el tejido donde se encuentra mayor concentración de O-GlcNAc, en los últimos años muchos estudios se han centrado en el estudio de la O-GlcNAc en patologías neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson [185][186]. De hecho, algunos autores han clasificado al Alzheimer como “diabetes tipo 3” [187][188]. Las neuronas afectadas en esta enfermedad muestran alterado el metabolismo de la glucosa acompañado de una disminución de la O-GlcNAc global [189][190]. Además, varios estudios en células neuronales demuestran una interacción entre la O-GlcNAc y la fosforilación de la proteína “tau” [191]. La sobreexpresión de OGT en neuronas incrementa la O-GlcNAc de “tau” y a su vez disminuye su fosforilación en sitios clave implicados en el desarrollo del Alzheimer [192]. Por otra parte, se ha demostrado que la esclerosis lateral amiotrófica, otra enfermedad neurodegenerativa, cursa con una reducción de la O-GlcNAc [193].

Al contrario que en situaciones de estrés agudo, donde la O-GlcNAc parece tener un papel protector, (como el que se produce en tejido cardíaco tras un infarto [172–174]), cuando la O-GlcNAc está elevada de forma crónica, contribuye directamente al desarrollo de cardiomiopatías. La disfunción mitocondrial asociada a diabetes que aparece en cardiomiocitos está mediada por un incremento en la O-GlcNAc de proteínas mitocondriales, incluidas proteínas clave de la cadena de transporte de electrones [194]. Además, una excesiva O-GlcNAc de proteínas implicadas en la contracción del músculo cardíaco contribuye a su disfunción en diabetes [160]. Por lo tanto, la O-GlcNAc juega un papel fundamental en la etiología de la cardiomiopatía diabética por diferentes mecanismos [175].

Dada la extensa relación entre O-GlcNAc y fosforilación y la ampliamente descrita importancia de la fosforilación en los mecanismos implicados en cáncer, no es una sorpresa que la O-GlcNAc juegue un importante papel en la etiología del cáncer.

Numerosos oncogenes y supresores tumorales juegan un papel principal en la regulación de la transcripción, y casi todos son susceptibles de O-GlcNAc, como c-Myc [148][149][195], retinoblastoma (Rb) [196], supresor tumoral HIC1 [197],  $\beta$ -catenina [157], receptores de estrógenos [198–200] y otros. La O-GlcNAc no solo regula procesos de transcripción implicados en cáncer, sino que también afecta al tráfico de

moléculas de adhesión celular importantes para el proceso de metástasis. Por ejemplo, la O-GlcNAc de  $\beta$ -catenina no solo afecta a su localización nuclear sino que también bloquea su asociación con E-cadherina, una molécula crítica para la adhesión de células epiteliales. La pérdida del transporte de E-cadherina a la superficie celular de estas células es un importante fenómeno implicado en la metástasis de células del cáncer [201]. Las células de cáncer de mama muestran aumentada su O-GlcNAc global, y una reducción de esta modificación inhibe el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* y disminuye su capacidad invasiva [202]. Además, los linfocitos muestran un aumento en su O-GlcNAc durante la leucemia linfocítica crónica [203].

En resumen, la O-GlcNAc de proteínas se muestra como un importante proceso involucrado en la etiología de enfermedades crónicas.

## ***2. OBJETIVOS***

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que en el cartílago articular de pacientes con artrosis avanzada, existe un incremento significativo de la cantidad de proteínas O-N-Acetil-glicosiladas en comparación a la cantidad de proteínas que contienen esta modificación en el cartílago articular de sujetos que no presentan evidencia de enfermedad articular, y de la misma edad y sexo. Con estos antecedentes, los objetivos de esta tesis doctoral fueron:

1. Identificar qué proteínas O-GlcNAc son características del cartílago artrósico, y cuales lo son en el cartílago sano, con el fin de estudiar a qué procesos celulares se asocian estas proteínas. Para ello, realizaremos un análisis proteómico de extractos proteicos enriquecidos en esta modificación post-traducciona l tanto en cartílago procedente de sujetos sanos, como procedente de pacientes con artrosis. Posteriormente, clasificaremos las proteínas O-GlcNAc características de cada condición según los procesos biológicos en los que participan, con el fin de establecer un perfil de procesos controlados por O-GlcNAc.
2. Estudiar el posible papel de un incremento en la cantidad de proteínas O-GlcNAc sobre diferentes procesos celulares característicos de los condrocitos artrósicos, como son la proliferación celular, la diferenciación hipertrófica o la calcificación de la matriz extracelular. Para ello, emplearemos un modelo in vivo en el que estos procesos se encuentran activos, como es la osificación endocondral que tiene lugar en la placa de crecimiento de los huesos largos durante el desarrollo.
3. Analizar los mecanismos celulares implicados en la diferenciación hipertrófica del condrocito que pueden estar modulados por la O-GlcNAc de proteínas. Para ello, emplearemos un modelo in vitro de diferenciación condrogénica de la línea celular ATDC5, que será tratada con diferentes estímulos inductores de diferenciación hipertrófica. En este modelo, estudiaremos cuál es el efecto de incrementar la cantidad de proteínas O-GlcNAc, así como los mecanismos celulares implicados en estos efectos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3.I. ESTUDIOS EN PACIENTES.**

Los resultados de esta tesis incluyen muestras de cartílago articular de 6 pacientes sometidos a una artroplasia total de rodilla en el servicio de cirugía ortopédica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Todos ellos presentaban evidencias clínicas y radiológicas, de acuerdo con los criterios de la Sociedad Americana de Reumatología. Asimismo, se analizaron muestras de cartílago de 6 donantes sin evidencias de patología articular, obtenidos a través del Servicio de Trasplantes del Hospital Clínico de Barcelona. Los comités éticos locales aprobaron el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes.

Para ambos grupos, se seleccionaron individuos de edades similares, siendo todos mayores de 65 años, y se aseguró la presencia compensada de ambos sexos. El grupo de los pacientes artrósicos estaba formado por 3 hombres y 3 mujeres. En el caso de los donantes sanos 4 fueron hombres y 2 fueron mujeres.

Durante la cirugía se recogieron muestras de cartílago del cóndilo femoral y del plato tibial. Dado el carácter parcheado del daño articular en la artrosis, se han utilizado al menos tres porciones diferentes de cartílago para evitar resultados sesgados. Las muestras obtenidas se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente llevar a cabo el protocolo de extracción de proteínas totales y realizar el análisis proteómico.

### **3.II. ESTUDIOS EN ANIMALES.**

Para determinar la dosis óptima de thiamet-G, se administró a seis ratones C57/BL/6 (Harlan Interfauna Ibérica, S.A., Barcelona, Spain), de 23 días de edad, inyecciones intraperitoneales de 10, 20, 100, 200 o 500 mg/kg de thiamet-G disuelto en PBS, y se sacrificaron ocho horas después con el fin de evaluar los niveles de O-GlcNAc en diferentes tejidos (cerebro, hígado, músculo y rodilla). El tiempo de sacrificio se eligió en base a datos previamente publicados sobre thiamet-G en roedores, que demostraron que el pico de nivel de proteínas O-GlcNAc tras la administración del fármaco se consiguió tras 8-10 horas [204–206]. Los tejidos se recogieron inmediatamente tras el sacrificio, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Para los estudios de hipertrofia condrocitaria *in vivo*, ocho ratones de 23 días C57/BL/6 recibieron inyecciones intraperitoneales diarias de 20 mg/kg de thiamet-G durante quince días, mientras que el grupo control (n=8) recibió inyecciones de PBS. Los

ratones se pesaron al inicio y al final del estudio. Todas las prácticas animales se desarrollaron conforme a las guías del Comité Internacional e Institucional de Investigación Animal.

### **3.III. ESTUDIOS EN LÍNEAS CELULARES.**

Las células precondrogénicas ATDC5 se obtuvieron del banco de células “RIKEN Cell Bank” (Ibaraki, Japón). Estas células fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (Dulbecco’s modified Eagle’s medium/Ham’s F12 medium) (1:1) (Lonza, Walkersville, MD, USA), conteniendo un 5% de suero fetal bovino (FBS, Lonza, Walkersville, MD, USA), penicilina (100U/ml), y estreptomicina (100 U/ml) (Lonza, Walkersville, MD, USA).

Para inducir la diferenciación, el medio se cambió por 5% FBS-DMEM/F12, con 10 microgramos/ml de transferrina humana,  $10^{-8}$  M de selenito de sodio y 10 microgramos/ml de insulina bovina (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Las células se cultivaron a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub> durante diferentes tiempos, hasta 21 días.

Para las diferentes condiciones de cultivo indicadas, el inhibidor de OGA, thiamet-G [204,205] a una concentración final de 1  $\mu$ M, o ácido ascórbico a dosis de 50  $\mu$ g/ml, o agua estéril (vehículo), fueron añadidos en lugar de insulina.

Para suprimir la presencia de UDP-GlcNAc (el donador de O-GlcNAc), se inhibió la actividad de la enzima GFAT-1, utilizando 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON; Sigma, Saint Louis, MO, USA) a una dosis de  $10^{-5}$ M, en presencia o ausencia de insulina. El medio de cultivo fue cambiado cada dos o tres días.

Medio de cultivo	FBS (5%)	P-E (100 u/ml)	Insulina (10 µg/ml)	Transf. Humana (10 µg/ml)	Selenito Sódico (10 <sup>-8</sup> M)	Th-G (1 µM)	DON (10 <sup>-5</sup> M)	Ácido Ascórbico (50 µg/ml)
<b>Mant.</b>	✓	✓	□	□	□	□	□	□
<b>Dif.</b>	✓	✓	✓	✓	✓	□	□	□
<b>Th-G</b>	✓	✓	□	✓	✓	✓	□	□
<b>Asc.</b>	✓	✓	□	✓	✓	□	□	✓
<b>DON</b>	✓	✓	□	✓	✓	□	✓	□
<b>Dif+DON</b>	✓	✓	✓	✓	✓	□	✓	□

**TABLA 1.** Composición de cada uno de los medios de cultivo utilizados para células ATDC5. Mant: Medio de mantenimiento; Dif: Medio para inducir diferenciación hipertrófica con insulina; Th-G: Medio para tratar el cultivo con thiamet-G; Asc: Medio para inducir diferenciación con ácido ascórbico; Medio para tratar las células con DON.

### 3.IV. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS.

Se obtuvieron muestras histológicas de los ratones usados para el estudio *in vivo* del efecto de acumulación de proteínas O-GlcNAc en la diferenciación hipertrófica. Ambas tibias se aislaron de tejidos blandos y se midieron bajo un microscopio de disección. Después se fijaron en formaldehído al 4% durante 24h, y se decalcificaron con Osteosoft® (VWR International Eurolab, Barcelona, Spain) durante dos días. Las tibias fueron posteriormente deshidratadas en diluciones seriadas de etanol, incluidas en parafina y los cortes de parafina realizados (5 µm) se tiñeron con hematoxilina y eosina. Dos secciones de cada placa de crecimiento se visualizaron a un aumento 20x y las imágenes se capturaron usando un microscopio Leica DMD108 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain). Las imágenes se alinearon de forma que la dirección de la placa de crecimiento fuera vertical a la pantalla del ordenador. Así, de cada placa de crecimiento se midió la altura total y la altura de la zona hipertrófica, delineando la parte alta de la placa de crecimiento, el límite entre la zona proliferativa e hipertrófica y la unión condro-ósea. Estas zonas se establecieron atendiendo a las características morfológicas de los condrocitos, y en los cambios de tinción de la matriz [207,208]. La altura vertical

de cada zona se midió en la parte central de la imagen a intervalos similares a lo largo de las secciones (n=9 o 10 por sección). Los valores para cada ratón se obtuvieron como promedio de 40 medidas [2 secciones x 10 localizaciones x 2 placas de crecimiento (derecha e izquierda)]. Para el conteo de células en la zona hipertrófica, se contaron el número de condrocitos hipertróficos en áreas fijas de 1000  $\mu\text{m}^2$  (200 $\mu\text{m}$  x 50 $\mu\text{m}$ ). Se contaron tres áreas diferentes en cada placa de crecimiento, y la media de esas medidas se tomó como número de células//1000  $\mu\text{m}^2$  en cada placa de crecimiento.

### **3.V. INMUNOHISTOQUÍMICA.**

La localización de Col X en la placa de crecimiento de los ratones tratados con thiamet-G y vehículo se llevó a cabo utilizando cortes de parafina de 5  $\mu\text{m}$  de grosor. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas con concentraciones decrecientes de etanol. La peroxidasa interna se inhibió con una solución de metanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) y posteriormente se incubaron los cortes con tripsina [0,1% peso/vol en CaCl<sub>2</sub> (0,1%) pH 7)] durante 15 minutos a 37 °C para exponer el antígeno. La tinción inmunohistoquímica de Col X se realizó con un anticuerpo rabbit anti-Col X (cortesía de Dr. Danny Chan, University of Hong Kong, China) incubándolo O.N. a 4°C en cámara húmeda. El anticuerpo secundario biotinilado, junto al kit ABC, (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), se aplicó para obtener la señal quimiluminiscente. Las secciones fueron finalmente contrastadas con hematoxilina y montadas en DPX (VWR International Ltd, Poole, England).

En paralelo se realizaron controles negativos, eliminando el anticuerpo anti Col X de la solución de incubación.

### **3.VI. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL.**

Las muestras de cartílago articular humano y los tejidos de cerebro, hígado, músculo y rodilla de ratones se pulverizaron mediante homogeneización mecánica en una cámara enfriada previamente con nitrógeno líquido. El homogeneizado se resuspendió en un tampón de lisis frío (15mM HEPES pH 7,3, 10% glicerol, 0,5% Nonidet P-40, 250mM NaCl, 1mM EDTA) que incluía inhibidores de proteasas específicos [Phenil-metil-sulfonil-fluoride (PMSF) 0,1M, cóctel de inhibidores de proteasas comercial (CIP;

Sigma, St. Louis, MO, USA) y thiamet-G 1 $\mu$ l/ml (donado por la Dra. Natasha E. Zachara, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA).

Las proteínas totales de los cultivos celulares se extrajeron, tras el lavado con PBS 1M, aplicando directamente sobre las células el tampón de lisis frío especificado anteriormente.

En ambos casos, el tampón se dejó actuar durante 15 minutos a 4 °C y se centrifugó las muestras a 12000 r.p.m., 15 minutos a 4 °C. La concentración de proteína total se midió con el método del ácido bicinonínico (BCA) detallado a continuación.

### 3.VII. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Las muestras de proteínas extraídas fueron cuantificadas por el método de BCA, una sal sódica capaz de formar un complejo, con iones Cu<sup>1+</sup>, de color púrpura en medio alcalino. Así, el método se basa en monitorizar el ión cuproso producido en la reacción de las proteínas con Cu<sup>2+</sup> en medio alcalino. Esto se llevó a cabo por medida de absorción espectrofotométrica a una longitud de onda de 540nm.

Se comprobó la homogeneidad de carga de proteínas entre diferentes muestras mediante la cuantificación de síntesis de  $\alpha$ -tubulina, una proteína estructural expresada constitutivamente, usando la técnica de *western blot*.

### 3.VIII. WESTERN BLOT.

Tras la cuantificación de proteína total, se extrajeron veinte microgramos de proteína de cada una de las muestras de los extractos de tejido de ratón y de cultivos celulares. Estas proteínas fueron cargadas y separadas en geles SDS-poliacrilamida para determinar la cantidad total de proteínas O-GlcNAc, así como la presencia de OGT, OGA, ERK, JNK, p38, Akt, GSK3 $\beta$ , y  $\beta$ -catenina. Las proteínas se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que fueron bloqueadas con leche desnatada al 3% en TBS con Tween20 al 0,5% a temperatura ambiente, durante una hora, y después incubada O.N. a 4°C con RL2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti OGT ab59135 (Abcam, Cambridge, UK), anti-OGA (ab345, cortesía del Dr. Gerald W. Hart, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA), anti-ERK, anti-fosfo ERK, anti JNK, anti-fosfo JNK, anti-p38, anti-fosfo p38, anti GSK3 $\beta$ , anti fosfo GSK3 $\beta$  o anti  $\beta$ -catenina (todos de Cell Signaling, Danvers, MA,

USA), o anti Akt1/2/3 o fosfo-Akt (Ser 474) (ambos de Santa Cruz), diluidos en BSA al 3% en TBS con Tween20 al 0,5%. A continuación, la unión del anticuerpo se visualizó por quimioluminiscencia utilizando el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y el kit ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Las bandas se cuantificaron por densitometría y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias utilizando el software Quantity One (Version 4.6.3). Para la cuantificación de proteínas O-GlcNAc, se densitometraron la totalidad de las bandas de cada muestra.

### **3.IX. INMUNOPRECIPITACIÓN.**

Para detectar la O-GlcNAc de Akt, se incubaron 80 µg de proteína total de los cultivos de ATDC5 con 50 µl de bolas magnéticas (Dynabeads Protein G; Invitrogen) acopladas, siguiendo las indicaciones del fabricante, con 4 µl del anticuerpo policlonal de conejo anti Akt 1/2/3 (Santa Cruz) a 4°C O.N. Después, las bolas magnéticas fueron recuperadas y el sobrenadante se guardó para posteriormente medir la cantidad de Akt no unido.

Las bolas magnéticas se lavaron tres veces con PBS y después mezcladas con el buffer de carga y calentadas a 70°C durante 10 minutos. Las proteínas eluidas se separaron entonces de las bolas magnéticas y cargadas en geles de SDS-poliacrilamida y después inmunobloteadas con anticuerpo RL2, como se ha descrito anteriormente.

### **3.X. SELECCIÓN DE PROTEÍNAS O-GLCNAC**

Tras homogeneizar y cuantificar los extractos de proteína total de cartílago humano, se seleccionaron 25 µg de proteína de cada individuo de forma que agrupando los individuos por grupo se consiguiese un total de 1500 µg de proteína de cartílago artrósico (6 pacientes OA), y 1500 µg de proteína de cartílago sano (6 donantes sin evidencias de OA).

Estos dos extractos se sometieron a cromatografía de afinidad usando para ello columnas de lectina WGA (Wheat Germ Agglutinin) inmovilizada en agarosa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las lectinas son proteínas que tienen una alta afinidad a residuos de carbohidratos, y la lectina WGA se une selectivamente a GlcNAc y a estos residuos terminales presentes en las proteínas O-GlcNAc. El extracto proteico se incubó con la columna de lectina durante 10 minutos en agitación a temperatura

ambiente. Tras dos lavados, las proteínas se eluyeron con una solución de exceso de moléculas de GlcNAc (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Una vez obtenidos los extractos enriquecidos en proteínas O-GlcNAc se procedió a preparar las muestras para su posterior análisis de identificación por espectrometría.

### **3.XI. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA ANÁLISIS ESPECTROMÉTRICO.**

Para la identificación de proteínas O-GlcNAc por espectrometría de masas, se prepara la muestra a partir del extracto conseguido tras el enriquecimiento por lectina WGA. Con el objetivo de eliminar azúcares y concentrar la muestra, se realizó la digestión del extracto proteico en solución con tripsina, utilizando un filtro para centrífuga, previa solubilización y desnaturalización de las proteínas. En resumen, 250 µL del extracto proteico se trataron con DTT (Ditiotreitol) 25mM, para reducir los puentes disulfuro, y se incubó a 56 °C durante 30 min. Después se transfirió la muestra a un filtro tipo Amicon® NANOSEP 10 K OMEGA (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Se trató con iodoacetamida 55mM 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad para bloquear la reducción de los puentes disulfuro modificando las cisteínas por carbamidometilación. Se lavó varias veces con TEAB (bicarbonato trietil amonio) seguido de centrifugación, y se añadió la tripsina recombinante 1/10 (p/p) incubando a 37 °C durante 16 horas. Posteriormente se recogieron los péptidos filtrados mediante centrifugación. Este protocolo de digestión ha demostrado ser más eficaz que otros métodos anteriormente descritos [209].

Los péptidos se secaron mediante centrifugación a vacío y se acidificaron con TFA (ácido trifluoroacético) 0.1% y para limpiar y concentrar se pasaron por una microcolumna de PorosR2® (PerSeptive Biosystems). Se lavó 3 veces y se procedió a eluir los péptidos con acetonitrilo 80% TFA 0.1. Se secó la muestra y se resuspendió en 25 µl de ácido fórmico 0.1% acetonitrilo 2%. Luego se procedió al análisis de los péptidos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas tipo QTRAP (cuadripolo/trampa lineal).

### **3.XII. ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

Los péptidos fueron analizados en un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo/trampa lineal QTRAP 5500 (AB Sciex, Toronto, Canada). La cromatografía se llevó a cabo en un sistema Eksigent nano-LC (Eksigent, Dublin, CA, USA). El solvente A fue agua milliQ con 0,1% de ácido fórmico y el solvente B, acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico. Se inyectaron 5µl de la muestra en una precolumna ChromXP C18 – 3µm, 120 Å ( 350 µm x 0,5 mm) y, después, los péptidos fueron eluidos en una columna de fase reversa Eksigent, C18, de 75 µm de diámetro interno y 15 cm de longitud con un tamaño de partícula de 3 µm. El gradiente utilizado fue el siguiente: 0–90 min 30% B, 90–105 min 60% B, 105–106 min 95% B, 106–111 min 95% B, 111–112 min 5% B, 112–120 min 5% B y el flujo de 300 nl/min. Se fragmentaron los 6 picos más intensos en cada espectro que superaban los 15000 cps con cargas de +2 a +4 incluyendo los de carga indeterminada.

### **3.XIII. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.**

Para la identificación de proteínas se utilizó el motor de búsqueda MASCOT v 2.3.0.

Los parámetros de búsqueda que se utilizaron fueron:

Base de datos: SwissProt

Taxonomía: Homo sapiens (human)

Tolerancia de péptido: 0.15 Da

Tolerancia del fragmento: 0.15 Da

Ausencia de sitio de corte: 1

Modificación constante: Carbamidometilación de las cisteínas

Modificaciones variables: Metionina oxidada

HexNAc (N),HexNAc (S),HexNAc (T)

Como filtro en la identificación se aplicó el algoritmo Percolator® siendo el FDR (identificación de falsos positivos) de 0% en todas las identificaciones.



### **3.XIV. CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR GRUPOS BIOLÓGICOS.**

Para el análisis de los procesos biológicos en los que están involucradas las proteínas identificadas se usó el software GeneCodis [210][211][212]. Este programa identifica todos los procesos biológicos en los que participa una determinada proteína. Se delimitó la búsqueda al organismo “homo sapiens” y a la identificación de procesos biológicos, y se introdujeron los conjuntos diferentes de proteínas por su número de SwissProt.

Por un lado se analizaron los procesos biológicos de las proteínas que se encontraron exclusivamente en pacientes artrósicos, y por otro lado los de las proteínas identificadas exclusivamente en donantes sanos.

### **3.XV. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.**

Para los estudios de expresión génica, las células se recogieron a los tiempos indicados y se obtuvo el RNA total usando el reactivo TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). El RNA (1 µg) se retrotranscribió usando el kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las instrucciones del manual, y la expresión de RNA se cuantificó por PCR a tiempo real usando el sistema Step One Plus Detection system (Applied Biosystems) como se ha descrito previamente [213]. Los oligonucleótidos específicos marcados con sonda fluorescente (FAM) en el extremo 5', así como la sonda FAM TaqMan para el colágeno tipo IIa1 (Col II) (Assay ID: Mm01309565\_m1), colágeno tipo X (Col X) (Mm00487041\_m1), agrecano-1 (Agg) (Mm00545794\_m1), receptor de la hormona paratiroidea-1 (PTH1R) (Mm01250244\_m1), indian hedgehog (IHH) (Mm00439613\_m1), runx2 (Mm00501584\_m1) and alkaline phosphatase (ALP Mm00475834\_m1) fueron comprados a Applied Biosystems. Como control endógeno se usó una sonda pre-diseñada GAPD FAM/MGB (rRNA) (4352932E, Applied Biosystems), y la expresión de mRNA fue normalizada por el RNA de GAPD en cada muestra. Los valores experimentales para cada gen fueron después normalizados por el valor de referencia, (a las células en el día 0 se les dio el valor de 1 para cada gen).

### **3.XVI. TINCIÓN AZUL ALCIAN.**

Las células ATDC5 se sembraron en placas p65 y se cultivaron en los diferentes medios testados. En cada tiempo establecido, las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol durante 3 minutos a -20°C. A continuación se tiñeron con 0.1% Alcian blue 8GS (Sigma) en 0.1 M HCl durante 2 h en agitación suave, a temperatura ambiente. Las placas de cultivo teñidas se lavaron con PBS tres veces y se extrajo el colorante con 2 ml de guanidinio-HCl 6M durante 2 h a temperatura ambiente. La lectura de densidad óptica de los extractos de cada placa se realizó a 620 nm.

### **3.XVII. ESTUDIOS DE ZIMOGRAFÍA.**

Se determinó la actividad de las gelatinasas metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de las células ATDC5 sembradas a una densidad de  $6 \times 10^3$  cels/cm<sup>2</sup>. La misma cantidad de proteínas se cargó en un gel al 10% de poliacrilamida conteniendo un 0,1% de gelatina. Las proteínas se separaron por SDS/PAGE bajo condiciones no reductoras a 4°C. Después, los geles se lavaron con Tritón X-100 y se incubaron con buffer de proteólisis (50mM Tris-HCl pH7.6, 0.2mM NaCl, y 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2% Nonidet P-40 y 0.01% Tween 20) durante 16 h a 37°C. Por último los geles fueron incubados con buffer de tinción (0.05% Coomassie blue, 50% metanol, 10% ácido acético), seguido del buffer para desteñir (4% metanol, 8% ácido acético). Los geles se escanearon usando el Gel Doc EZ scanner (Bio-Rad Laboratories, Inc).

### **3.XVIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.) y se analizaron utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para llevar a cabo comparaciones múltiples, se recurrió al test de Kruskal-Wallis. La hipótesis nula se rechazó en cada análisis estadístico cuando el valor de p era  $<0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS para Windows versión 11.0 (SPSS, Chicago, IL)

#### ***4. RESULTADOS***

---

#### **4.I. ESTUDIO PROTEÓMICO DIFERENCIAL DE LA O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILACIÓN EN CARTÍLAGO ARTICULAR DE PACIENTES ARTRÓSICOS Y DONANTES SANOS.**

En los últimos años, el estudio de modificación de proteínas por O-GlcNAc en la patogenia de enfermedades como Alzheimer, diabetes o cáncer ha cobrado especial relevancia. Sin embargo, no se han descrito estudios previos acerca de la O-GlcNAc de proteínas en otra enfermedad, que al igual que las anteriores, tiene carácter crónico y está asociada a la edad: la artrosis. Nuestro laboratorio mostró por primera vez a la comunidad científica resultados que demuestran que este tipo de proteínas se encuentra alterado en la artrosis. La cantidad total de proteínas O-GlcNAc se encuentra incrementada en el cartílago de pacientes artrósicos en comparación con el cartílago sano [214]. Los mismos resultados se obtuvieron en un modelo experimental de artrosis en conejo, mostrando el cartílago de conejos artrósicos mayores niveles de proteínas O-GlcNAc en comparación con conejos sanos. Los métodos de medida de proteínas O-GlcNAc detectaron todas las proteínas que presentaban esta modificación post-traducciona, pero no permitieron identificar qué proteínas eran las que se modificaban con residuos de GlcNAc en el cartílago. En continuidad con esos estudios, el primer objetivo de esta tesis fue identificar el perfil de proteínas O-GlcNAc presentes en el cartílago artrósico. Identificaremos de igual modo las proteínas de este tipo presentes en el cartílago sano, para posteriormente realizar un análisis comparativo entre estos tejidos. Además, determinaremos los procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas, con el objetivo de conocer los procesos en los que la modificación por O-GlcNAc se muestra relevante para el desarrollo de la artrosis.

##### **4.I.A. Identificación de proteínas O- $\beta$ -N-Acetilglicosiladas en cartílago articular sano y artrósico.**

Tras la extracción de proteínas totales de las muestras de cartílago, se utilizaron columnas de lectina WGA inmovilizada en agarosa para el enriquecimiento selectivo en proteínas O-GlcNAc. Las lectinas son proteínas con afinidad selectiva a residuos de carbohidratos. En concreto, la lectina WGA se une con mayor preferencia a los extremos de N-Acetilglucosamina presentes en numerosas glicoproteínas.

Las fracciones enriquecidas en proteínas O-GlcNAc fueron limpiadas y digeridas y

posteriormente procesadas por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas tipo QTRAP.

SANOS	
Nº Swissprot	Proteína
P60709	Actina citoplasmática 1
P16112	Proteína central del agregano
P02765	Glicoproteína alfa-2-HS
P10909	Clusterina
P02458	Cadena alfa-1 del colágeno tipo II
P12109	Cadena alfa-1 del colágeno tipo VI
P01024	Proteína C3 del Complemento
P07585	Decorina
P02675	Cadena beta del fibrinógeno
Q9BYJ0	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento de fibroblastos
P23142	Fibulina 1
P01834	Región constante de la cadena kappa de las inmunoglobulinas
P0CG05	Región constante de la cadena lambda-2 de las inmunoglobulinas
P19827	Cadena pesada H1 del inhibidor de inter-alfa-tripsina
P08779	Queratina citoesquelética 16 de tipo I
Q01546	Queratina citoesquelética 2 de tipo II
P12035	Queratina citoesquelética 3 de tipo II
P19013	Queratina citoesquelética 4 de tipo II
P13647	Queratina citoesquelética 5 de tipo II
P02538	Queratina citoesquelética 6A de tipo II
P04259	Queratina citoesquelética 6B de tipo II
P08729	Queratina citoesquelética 7 de tipo II
P05787	Queratina citoesquelética 8 de tipo II
P01042	Quininógeno I
P11279	Glicoproteína 1 de membrana asociada los lisosomas
O15232	Matrilina -3
Q16853	Oxidasa amina primaria de membrana
P05155	Inhibidor de la proteasa C1 del plasma
Q6S8J3	Miembro E de la familia del dominio POTE ankirina
Q15113	Potenciador 1 de la C-endopeptidasa del procolágeno
Q9UKZ9	Potenciador 2 de la C-endopeptidasa del procolágeno
P02760	Proteína 1 de enlace con la adrenomedulina obtenida del plasma
Q92954	Proteoglicano-4

Q92765	Proteína 3 de membrana relacionada con Frizzled
P07996	Trombospondina-1
P35443	Trombospondina-4
P04004	Vitronectina

**TABLA 2.** Proteínas O-GlcNAc identificadas exclusivamente en cartílago de donantes sanos.

Tras la identificación de las proteínas presentes en los extractos de cartílago de donantes sanos y de pacientes artrósicos, se realizó un análisis comparativo para determinar las proteínas diferenciales de cada tipo de muestra (Tablas 2 y 3), así como las comunes presentes en ambas (Tabla 4).

PACIENTES OA	
Nº Swissprot	Proteína
P62736	Actina, musculo liso aórtico
P0C0L4	Complemento C4-A
P02671	Cadena alfa de fibrinógeno
P24592	Proteína 6 de unión a la proteína similar al Factor de crecimiento de la insulina
P19012	Queratina citoesquelética 15, tipo I
P08727	Queratina citoesquelética 19, tipo I
Q14767	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento beta de transformación latente
P14555	Fosfolipasa A2, asociado a membrana
P00747	Plasminógeno
P0CG38	Miembro I de la familia del dominio POTE anquirina
A4D1T9	Proteasa de serina 37 probablemente inactiva
Q8TAA3	Subunidad similar a tipo-7-alfa del proteosoma
P06396	Gelsolina
P02768	Albumina sérica
Q96H86	Proteína dedo de Zinc 764

**TABLA 3.** Proteínas O-GlcNAc identificadas exclusivamente en cartílago de pacientes artrósicos.

El cartílago articular humano sano y artrósico comparte un amplio número de proteínas O-GlcNAc modificadas, sin embargo, nuestro análisis basado en el enriquecimiento por lectina WGA identificó subgrupos de proteínas O-GlcNAc diferenciales entre el estado sano y el enfermo.

En total, se encontraron 37 proteínas en el cartílago de donantes sanos que estaban ausentes en el cartílago de pacientes artrósicos, y 15 proteínas fueron exclusivas de pacientes artrósicos. Además se identificaron 31 proteínas presentes en ambos tipos de cartílago, sano y artrósico.

COMUNES SANOS Y OA	
Nº Swissprot	Proteína
P01011	Alfa-1-antiquimotripsina
P01009	Alfa-1-antitripsina
P01023	Alfa-2-Macroglobulina
P21810	Biglicano
Q9NQ79	Proteína ácida 1 del cartílago
O75339	Proteína 1 de la capa intermedia del cartílago
P49747	Proteína oligomérica de la matriz del cartílago
P00450	Ceruloplasmina
O15335	Condroadherina
P08603	Factor H de complemento
P08294	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] Extracelular
P02679	Cadena gamma de Fibrinógeno
Q06828	Fibromodulina
P02751	Fibronectina
P00738	Haptoglobina
P00739	Proteína relacionada con haptoglobina
P69905	Subunidad alfa de la hemoglobina
P68871	Subunidad beta de la hemoglobina
P02790	Hemopexina
P01876	Región C de la cadena Ig alfa-1
P19823	Cadena pesada H2 del inhibidor de tripsina-inter-alfa
P13645	Queratina citoesquelética 10, tipo I
P02533	Queratina citoesquelética 14, tipo I
P35527	Queratina citoesquelética 9, tipo I
P04264	Queratina citoesquelética 1, tipo II
P35908	Queratina citoesquelética 2 epidérmica, tipo II
P51884	Lumicano
P20774	Mimecano
A5A3E0	Miembro F de la familia del dominio POTE anquirina
P51888	Prolargina
P08670	Vimentina

**TABLA 4.** Proteínas O-GlcNAc identificadas presentes tanto en cartílago de donantes sanos como de pacientes artrósicos.

#### 4.I.B. Análisis biológico diferencial de proteínas O- $\beta$ -N-Acetilglicosiladas en cartílago articular sano y artrósico.

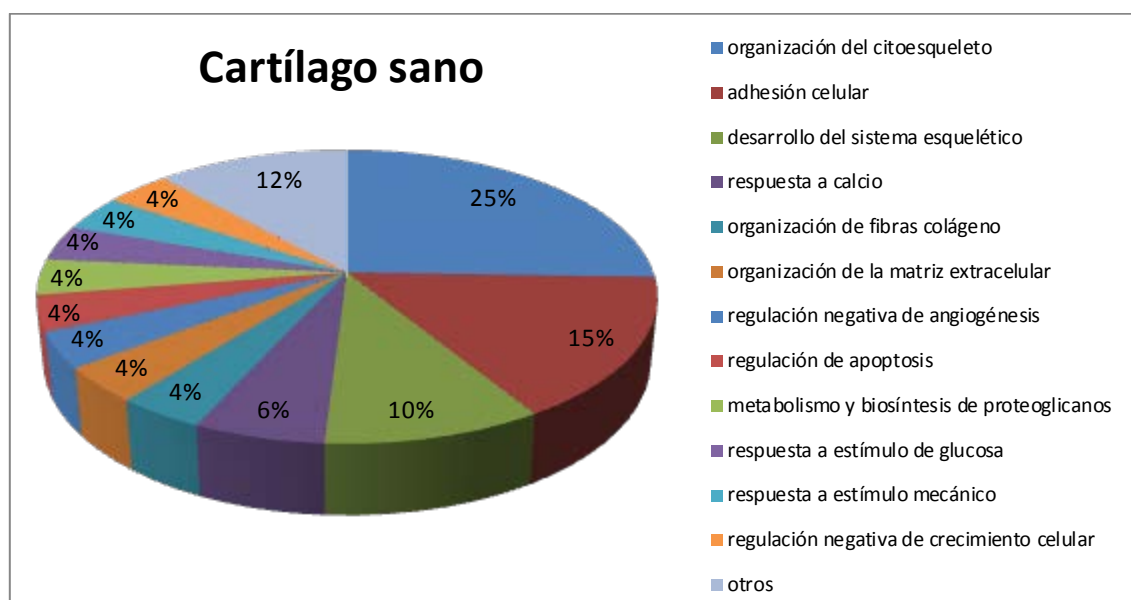
Una vez determinadas las proteínas diferenciales características de cada tipo de cartílago, utilizamos el software GeneCodis para agrupar estas proteínas según el proceso biológico en el que participan. Este software relaciona cada proteína con los procesos biológicos en los que ésta juega un papel relevante, pudiendo por tanto, asignar diferentes procesos biológicos a una misma proteína.

Se realizaron dos análisis independientes; por un lado se evaluó el grupo de proteínas encontradas exclusivamente en cartílago de donantes sanos (Figura 1) y por otro las que están únicamente en el cartílago de pacientes artrósicos (Figura 2).

El software puede identificar todos los procesos biológicos en los que interviene cada una de las proteínas analizadas, mostrando 152 procesos biológicos diferentes en el subgrupo de cartílago sano, y 51 en el caso de cartílago artrósico.

Para facilitar el análisis, escogimos solo los procesos más importantes revelados por GeneCodis, seleccionando 12 en cartílago sano y 12 en cartílago artrósico.

Los resultados se muestran como cantidad de proteínas presentes, expresado en porcentaje, que participan en un determinado proceso biológico.

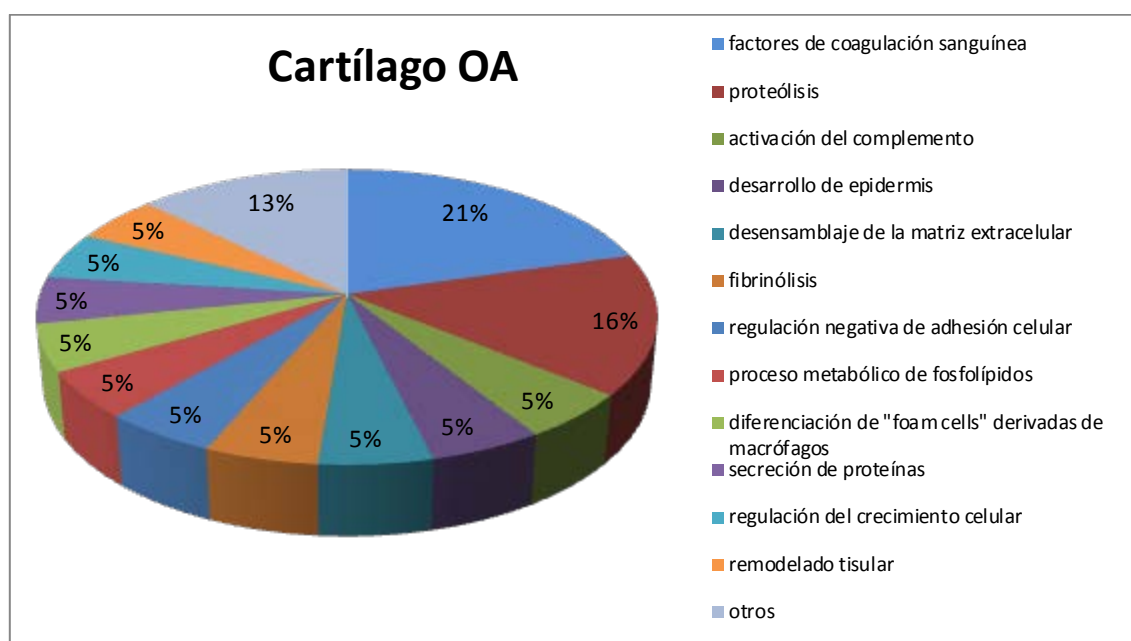


**FIGURA 1.** Distribución por procesos biológicos de las proteínas extraídas con columnas de lectina-WGA de cartílago de donantes sanos.



Alrededor de un 25% de las proteínas específicas de cartílago sano están involucradas en la “organización del citoesqueleto”, y más de un 15% juegan un papel importante en “adhesión celular”. Ninguno de estos procesos biológicos se encontró en el análisis de las proteínas exclusivas de pacientes artrósicos (no solo no se encuentran en la lista de principales procesos, sino que tampoco formaban parte de los 51 procesos identificados en total), sugiriendo que la modificación O-GlcNAc de proteínas puede jugar un papel crucial en la conservación de la integridad estructural de la célula en el cartílago sano. Además, proteínas involucradas en el “desarrollo del sistema esquelético”, la “respuesta a estímulo mecánico”, “biosíntesis de proteoglicanos” o la “inhibición de la angiogénesis” también estaban presentes en las muestras sanas y completamente ausentes en las artrósicas.

Todos estos procesos son propios del desarrollo y mantenimiento del cartílago, mostrando así que la O-GlcNAc de proteínas ayuda a preservar las características de este tejido en un estado sano.



**FIGURA 2.** Distribución por procesos biológicos de las proteínas extraídas con columnas de lectina-WGA de cartílago de pacientes artrósicos.

Curiosamente, en nuestro estudio diferencial de proteínas O-GlcNAc encontramos procesos biológicos opuestos. Por ejemplo, la “organización de la matriz extracelular” aparece en el listado de cartílago de donantes sanos, mientras que en el caso de cartílago artrósico encontramos el proceso de “desensamblaje de la matriz extracelular”. La

fibulina-1, encontrada solo en sanos, interacciona con otras proteínas de la ECM incluyendo fibronectina, laminina y fibrinógeno [215–217], jugando por tanto un papel crucial en la estructura y ensamblaje de la ECM. De manera contraria, el plasminógeno identificado exclusivamente en las muestras patológicas, participa en el proceso de fibrinólisis, colaborando así en la destrucción de la matriz extracelular. Ésta proteína se incluye también en el proceso de “regulación negativa de adhesión celular” presente en el cartílago artrósico, en contraposición a la notable cantidad proteínas que participan en la “adhesión celular” mencionada en el caso de donantes sanos.

Por otra parte, la modificación O-GlcNAc de proteínas que participan en “proteólisis”, la “diferenciación de células foam derivadas de macrófagos”, o el “metabolismo de fosfolípidos” fue encontrada en cartílago artrósico y completamente ausente en cartílago sano.

Nuestros resultados revelan que el cartílago artrósico muestra un perfil de proteínas O-GlcNAc diferente al cartílago sano. Además, las proteínas que se muestran diferenciales de cada tipo de cartílago participan en distintos procesos biológicos, permitiéndonos diferenciar el cartílago sano y artrósico en base a los procesos biológicos y subconjuntos de proteínas O-GlcNAc modificadas.

#### **4.II. INFLUENCIA DE PROTEÍNAS O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILADAS EN LA DIFERENCIACIÓN HIPERTRÓFICA CONDROCITARIA: MODELO *IN VIVO* EN RATONES.**

El cartílago articular se conoce como cartílago permanente, y presenta características diferentes al cartílago temporal. El cartílago temporal es remplazado por hueso a través de la osificación endocondral, mientras que el cartílago permanente evita entrar en esta ruta bajo condiciones normales. El proceso de diferenciación de células mesenquimales hacia el linaje condrocitario no finaliza con cartílago permanente, sino que por defecto culmina con la formación de hueso. Se ha postulado que para obtener el cartílago permanente, esta habitual ruta hacia la osteogénesis tiene que estar activamente bloqueada y los condrocitos articulares se encuentran congelados en la fase de condrocitos diferenciados. En los últimos años se ha demostrado que los condrocitos del cartílago OA pierden este bloqueo activo. Estos condrocitos muestran un fenotipo alterado y se comportan de manera similar a los condrocitos de la placa de crecimiento que han sufrido diferenciación terminal.

Nuestros resultados muestran que el cartílago artrósico se caracteriza por una pérdida de proteínas O-GlcNAc implicadas en procesos importantes para la homeostasis del cartílago articular. Así, la modificación de proteínas por O-GlcNAc parece tener un papel activo en el mantenimiento de las características del cartílago sano, mostrando el cartílago artrósico una pérdida de ese mantenimiento.

De este modo, el cartílago artrósico presenta simultáneamente una pérdida en la O-GlcNAc de proteínas importantes para las propiedades del cartílago articular, y una pérdida del bloqueo activo del condrocito diferenciado, que desemboca en un fenotipo hipertrófico. Por este motivo, nuestro siguiente objetivo será determinar si la O-GlcNAc de proteínas está relacionada con la diferenciación hipertrófica del condrocito.

Escogimos para estos estudios un modelo *in vivo* que incluye las tres etapas de diferenciación del condrocito: fase de proliferación, de hipertrofia y de calcificación. En la placa de crecimiento de los huesos largos encontramos simultáneamente todas estas fases.

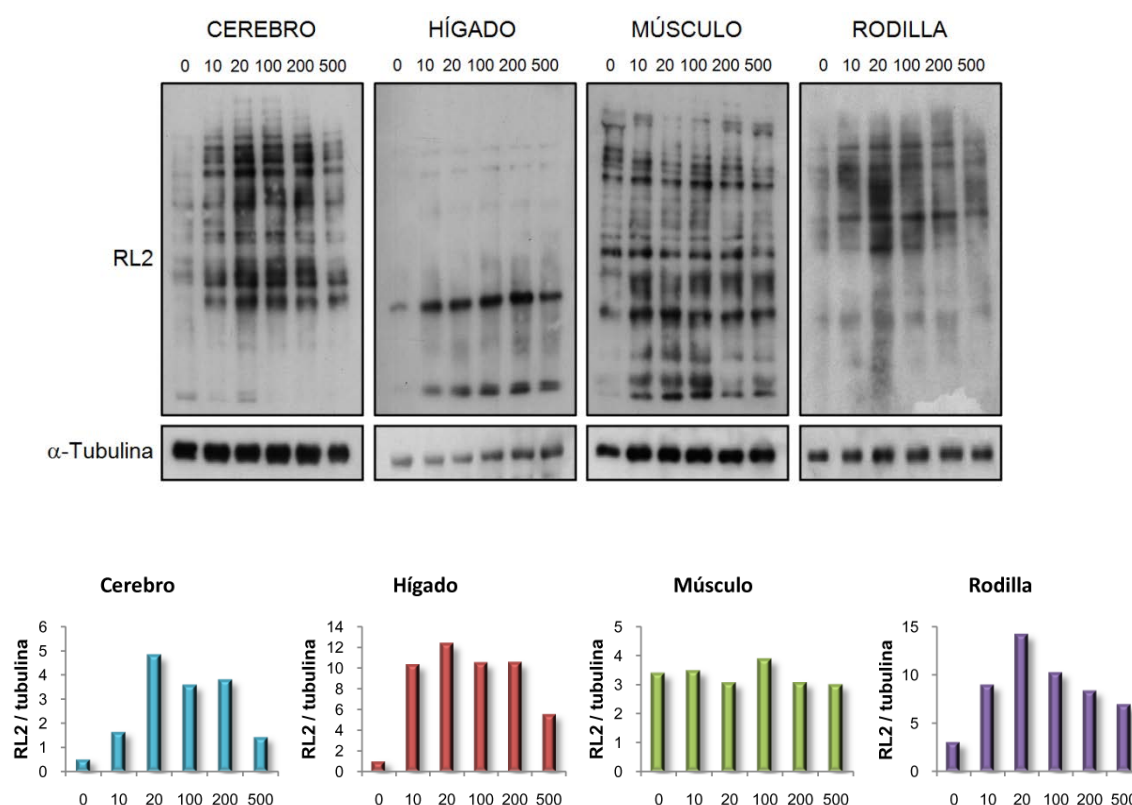
Así, estudiaremos el efecto de incrementar los niveles de O-GlcNAc sobre la placa de crecimiento de ratones en desarrollo, para evaluar si un cambio en los niveles de proteínas O-GlcNAc altera los condrocitos hipertróficos y si estas consecuencias son específicas de esta fase.

#### **4.II.A. La acumulación O-GlcNAc aumenta la diferenciación condrocitaria en la placa de crecimiento *in vivo*.**

El thiamet-G es un potente y selectivo inhibidor ( $K_i = 21$  nM) de la actividad enzimática de OGA, que actúa bloqueando el centro activo de manera competitiva. Esta molécula, al contrario que otros inhibidores de OGA, no inhibe la actividad de la hexosaminidasa- $\beta$  [205,218]. La inhibición de esta enzima conduce a un incremento en los niveles celulares globales de proteínas O-GlcNAc.

Para estudiar la efectividad del thiamet-G *in vivo* se llevaron a cabo experimentos preliminares en ratones C57BL/6. Centramos primero nuestro interés en el efecto dosis-dependiente del thiamet-G sobre los niveles de O-GlcNAc. Con este objetivo, los ratones fueron tratados con diferentes dosis de thiamet-G a través de una única inyección intraperitoneal, y sacrificados después de 8 horas. Posteriormente evaluamos la cantidad de proteínas O-GlcNAc en diferentes órganos diana donde se había descrito este tipo de modificación previamente.

Para este fin, usamos el anticuerpo monoclonal RL2, el cual reconoce específicamente los residuos de N-Acetilglucosamina unidos a serinas y treoninas de proteínas. Así pues, este anticuerpo no revelará una banda correspondiente a una determinada proteína, sino un patrón de diferentes bandas, dadas las múltiples proteínas modificadas reconocidas. Durante el sacrificio se recogieron muestras de cerebro, hígado, músculo y rodilla, y posteriormente éstas se sometieron al protocolo de extracción de proteína total. El análisis de los homogeneizados de estos tejidos por *western blot* usando el anticuerpo RL2, demostró que los niveles de O-GlcNAc en cerebro, hígado, y rodilla se incrementaban de una manera dosis-dependiente en respuesta a la administración del thiamet-G, aunque no se observó efecto en músculo con una única dosis de thiamet-G (Fig. 3).



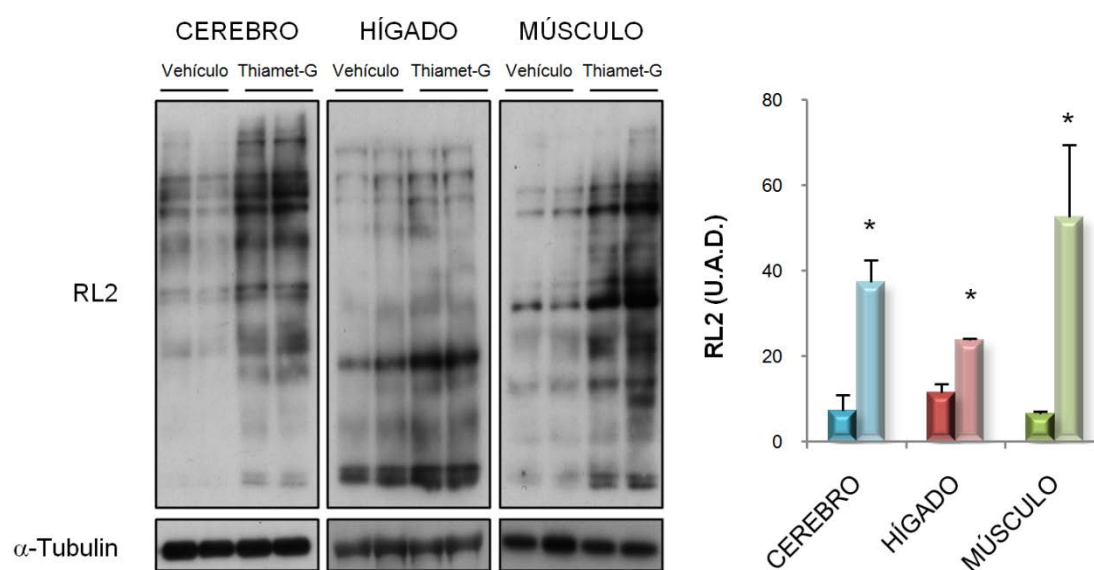
**FIGURA 3.** Análisis dosis-dependiente del efecto del thiamet-G en la cantidad de proteínas O-GlcNAc en diferentes tejidos de ratón, ocho horas después de la inyección de la droga. Los valores de dosis se expresan en mg/kg. Se muestra el *Western blot* de cada tejido y su correspondiente densitometría.

Además, no observamos mayores incrementos de O-GlcNAc en dosis mayores de 20 mg/kg por lo que se eligió esta dosis para los siguientes experimentos.

Una vez escogida la dosis óptima, ocho ratones C57/BL/6 de 23 días recibieron inyecciones intraperitoneales diarias de thiamet-G durante quince días, mientras que el grupo control (n=8) recibió inyecciones de PBS.

De nuevo, al final del tratamiento se recogieron muestras de cerebro, hígado y músculo, así como las rodillas de los ratones de ambos grupos.

En este caso, las rodillas se conservaron íntegras para estudios histológicos, y de los tejidos restantes se obtuvieron los homogeneizados. Se analizaron dichos extractos proteicos usando el anticuerpo RL2 mediante *western blot* para comparar entre los dos grupos de ratones los niveles de O-GlcNAc en estos tejidos. El tratamiento continuado durante 15 días con thiamet-G incrementó el nivel de proteínas O-GlcNAc en todos los tejidos testados en comparación con los tejidos de ratones tratados con el vehículo (Fig. 4). Curiosamente encontramos el mayor incremento en músculo, el cual no presentaba aumento de O-GlcNAc a lo largo de la curva de dosis en 8 horas, lo que demuestra la efectividad del tratamiento continuado de thiamet-G, con la dosis elegida, durante 15 días.



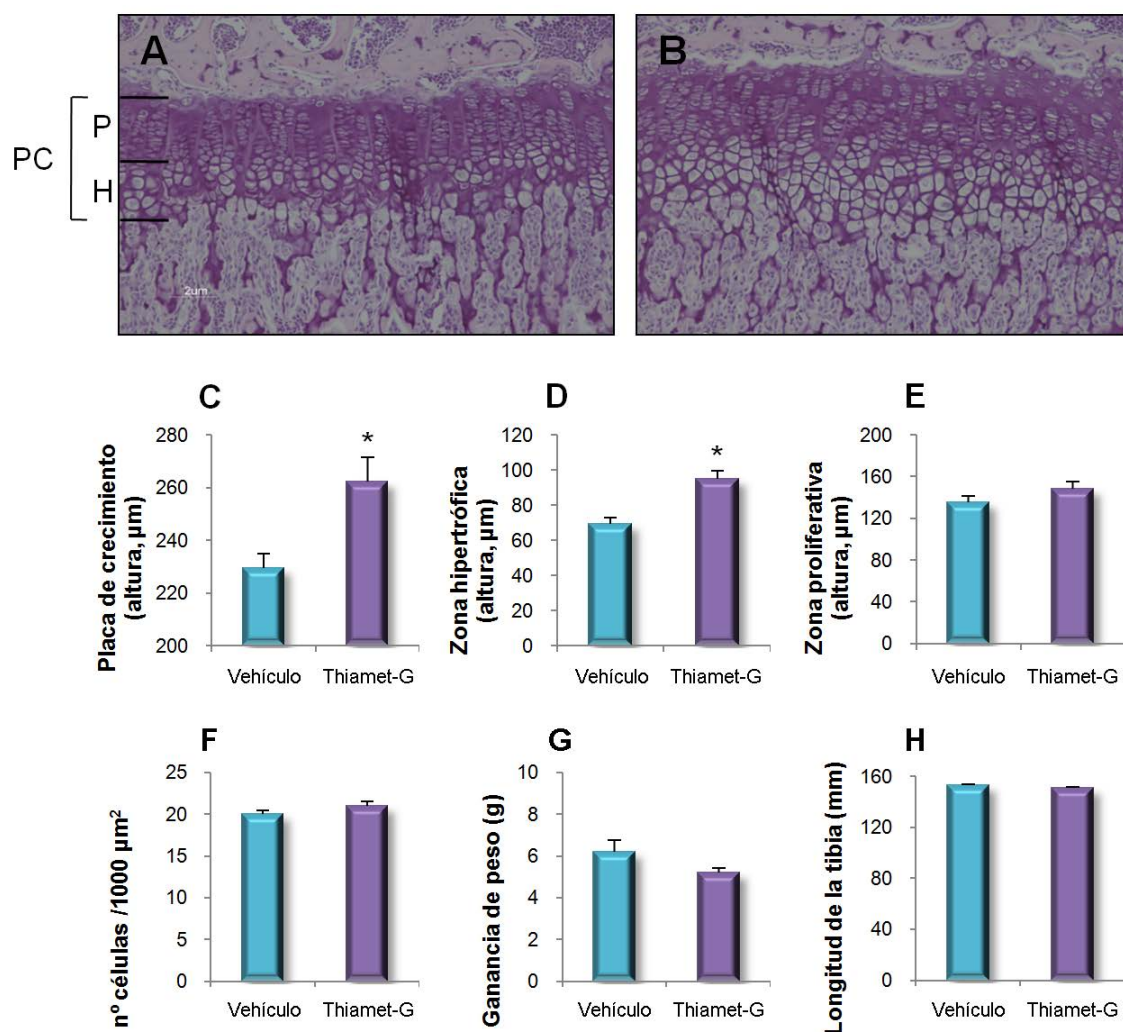
**FIGURA 4.** *Western blot* representativo mostrando los niveles de proteínas O-GlcNAc en diferentes tejidos de ratones tratados durante 15 días con 20 mg/kg de thiamet-G o vehículo. Las barras opacas muestran el análisis densitométrico del grupo tratado con vehículo y las transparentes el correspondiente al grupo tratado con thiamet-G (n=8 en cada grupo). Los resultados están expresados como la media  $\pm$ SEM. \*p < 0.05 vs. vehículo.

Lo siguiente que quisimos examinar fue el efecto que la acumulación de O-GlcNAc inducida por thiamet-G podría tener en la altura de la placa de crecimiento y de la zona hipertrófica de los ratones, dado que son las zonas donde sucede la diferenciación

condrocitaria. Con este propósito se examinó la placa endocondral de las tibias de ratones tratados con thiamet-G y se comparó con las tibias de ratones tratados con PBS. La placa endocondral es claramente identificable con tinción hematoxilina-eosina principalmente debido a su estructura y a los cambios de coloración entre el hueso calcificado y los condrocitos. Dentro de la placa de crecimiento, dicha tinción también permite diferenciar la zona proliferativa de la zona hipertrófica de condrocitos. Se estableció la zona proliferativa como aquella en la que los condrocitos muestran un fenotipo aplanado y disposición en columnas, así como una ligera coloración interna, y como zona hipertrófica aquella en la que los condrocitos son claramente más grandes, su disposición no muestra un orden fijo, y su interior muestra un tono blanquecino.

Una vez delimitadas las diferentes zonas, se realizaron medidas de la altura total de la placa de crecimiento, así como de la altura de la zona hipertrófica y la zona proliferativa.

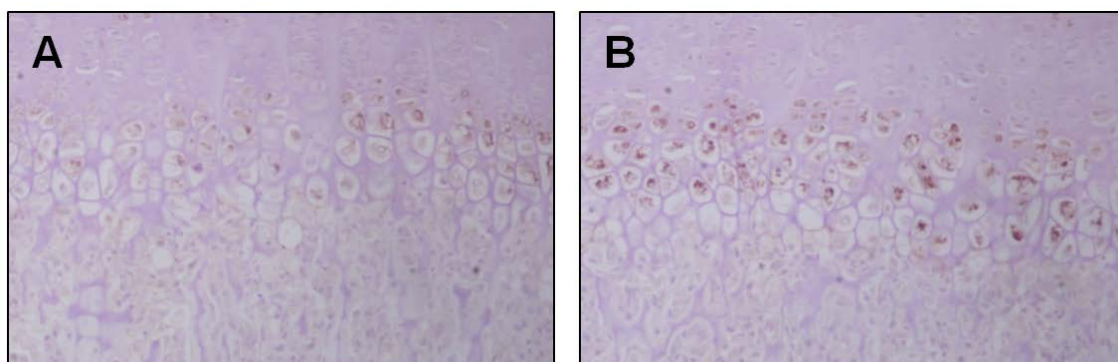
El tratamiento con thiamet-G incrementó la altura de la placa de crecimiento en comparación con las alturas observadas en los ratones tratados con vehículo. En detalle, la zona hipertrófica de condrocitos fue mayor al aumentar las proteínas O-GlcNAc pero la zona proliferativa no presentó diferencias en su altura entre los dos grupos de ratones. Esto refleja un efecto estimulante de la acumulación de O-GlcNAc sobre la diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento, efecto que parece actuar específicamente sobre la fase de diferenciación hipertrófica (Fig. 5A-5E).



**FIGURA 5.** Microfotografías de tinción hematoxilina-eosina de la placa de crecimiento representativas de ratones tratados con vehículo (A) o tratados con thiamet-G (B). Las barras muestran el efecto del thiamet-G en la altura de la placa de crecimiento (C), altura de la zona hipertrófica (D), altura de la zona proliferativa (E) número de condrocitos en 1000  $\mu\text{m}^2$  (F), ganancia de peso de los ratones (G) y longitud tibial (H). Aumento: 200X; \* $p < 0.05$  vs. vehículos. PC, Placa de crecimiento; P, Zona proliferativa; H, Zona hipertrófica.

Con el objetivo de comprobar si el incremento en la zona hipertrófica se debía a un aumento en el tamaño celular, contamos el número de condrocitos hipertróficos en 1000  $\mu\text{m}^2$  en las placas de crecimiento de los ratones. El thiamet-G no produjo ningún cambio en el número de células contadas por superficie (Fig. 5F), indicando que el tamaño de condrocito hipertrófico es similar en los dos grupos estudiados. Adicionalmente, no observamos ningún efecto significativo del thiamet-G en la longitud de las tibias o la ganancia de peso de los ratones tras el periodo de tratamiento (Fig. 5G, 5H).

Posteriormente quisimos corroborar si los condrocitos designados como hipertróficos en base a la tinción hematoxilina-eosina expresaban algún marcador característico de hipertrofia. Así, analizamos por inmunohistoquímica la presencia de ColX en la placa de crecimiento de los dos grupos de animales. La detección de ColX mostró más células teñidas en los animales tratados con thiamet-G frente a los tratados con suero salino.



**FIGURA 6.** Microfotografías mostrando la tinción de Col X en la zona hipertrófica de ratones tratados con vehículo (A) o tratados con thiamet-G (B). Aumento: 240X.

Nuestros resultados muestran que el acumulo de proteínas O-GlcNAc induce un incremento en la altura de la placa de crecimiento debido exclusivamente a un aumento de la zona hipertrófica de condrocitos. Este aumento se debe a la presencia de más células hipertróficas y no a un aumento en el tamaño de estas, ya que el conteo de condrocitos hipertróficos por unidad de superficie no mostró diferencias entre los dos grupos de ratones. La detección de uno de los marcadores principales de hipertrofia en la placa de crecimiento, corroboró el aumento específico de este fenotipo condrocitario.



### **4.III. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA O- $\beta$ -N-ACETILGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA HIPERTROFIA CONDROCITARIA.**

Tras comprobar el efecto que la acumulación de proteínas O-GlcNAc tiene en la zona de condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento, quisimos estudiar si la O-GlcNAc de proteínas tiene un papel específico en la diferenciación hipertrófica condrocitaria y cómo estas proteínas pueden actuar durante este proceso. Para esto, establecimos un modelo *in vitro* de hipertrofia condrocitaria y analizamos el papel de las proteínas O-GlcNAc en varios aspectos característicos del fenotipo hipertrófico.

#### **4.III.A. Estudio del perfil de expresión de genes hipertróficos en un modelo *in vitro* de diferenciación condrocitaria.**

Se eligió la línea celular ATDC5 para estos estudios porque ha demostrado ser muy útil como modelo *in vitro* para estudiar la diferenciación condrogénica [46,219,220].

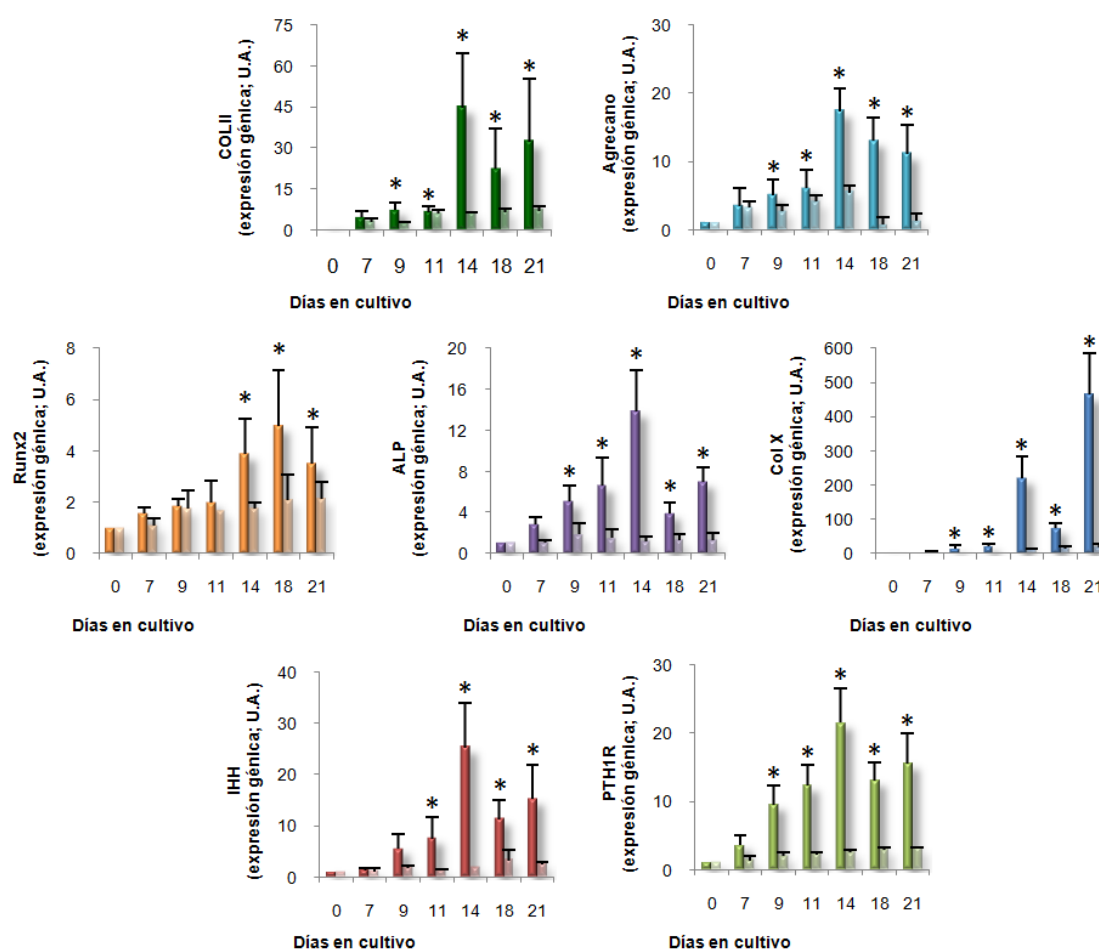
Este tipo celular se aisló inicialmente a partir de una línea de teratocarcinoma de ratón, AT805 [221], y hasta la fecha ha sido utilizada en más de 300 estudios. Con adición de insulina al medio, las células ATDC5 continúan creciendo, incluso en fase de post-confluencia, formando agregados celulares similares a nódulos de cartílago, que producen marcadores moleculares típicos del proceso de condrogénesis.

Primero se analizó la curva de tiempo de diferenciación de las células ATDC5 inducida con insulina, evaluando el incremento observado en la expresión de genes marcadores de diferenciación, tanto temprana como tardía. Para esto, las células fueron incubadas en presencia de insulina, recogidas a diferentes tiempos de cultivo, hasta el máximo de 21 días, y tras la extracción y la retrotranscripción de RNA, se realizaron estudios de expresión génica de varios marcadores mediante PCR a tiempo real.

Para descartar la posibilidad de que la expresión de estos marcadores sea inherente al crecimiento celular y por tanto no sea específico del proceso de diferenciación, cultivamos células ATDC5, durante los mismos tiempos descritos anteriormente, tratándolas únicamente con el vehículo utilizado, en ausencia de insulina. Así, se comparó la expresión génica, para los diferentes puntos de tiempo, en células tratadas con insulina o con el vehículo.

La expresión de cada gen se corrigió frente a la expresión del gen constitutivo metabólico GAPDH, en cada uno de los puntos medidos.

La insulina indujo un incremento gradual en la expresión de todos los marcadores de diferenciación: Col II, Agg, Runx2, ALP, Col X, IHH y PTH1R (Fig. 7). El incremento en la expresión de cinco de los genes testados fue estadísticamente significativo desde el día 9 en comparación con la expresión de cada gen en el día 0, el cual fue normalizado al valor 1. En presencia de insulina, la expresión de cada gen fue también significativamente diferente a la observada en ausencia de insulina al mismo tiempo, desde el día 9. En el caso de la expresión de IHH y Runx2 se alcanza la significación estadística en los días 11 y 14 respectivamente.



**FIGURA 7.** Expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria durante la diferenciación de células ATDC5. Las células ATDC5 fueron diferenciadas con 10 mg/ml de insulina (columnas opacas), o tratadas con el vehículo (columnas transparentes), durante diferentes periodos de tiempo, hasta 21 días. La expresión génica de los marcadores de diferenciación Col II, Agg, IHH, PTH1R, Runx2, ALP, Col X y GAPDH fue examinada por Real Time-PCR. Los resultados están expresados como la media del incremento inducido  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos independientes en comparación al día 0.

De este modo detectamos los tiempos, en nuestras manos, en los que se producen cambios significativos en varios marcadores de hipertrofia en el modelo *in vitro* de hipertrofia inducida por insulina. Además comprobamos que el crecimiento *per se* de estas células no induce la expresión de los genes característicos de la diferenciación hipertrófica.

#### **4.III.B. Modulación del sistema de O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación a lo largo del proceso hipertrófico.**

Una vez definido el modelo hipertrófico *in vitro*, quisimos estudiar si la diferenciación de las células ATDC5 estaba asociada con alguna alteración en la cantidad de proteínas O-GlcNAc utilizando el anticuerpo RL2 que específicamente reconoce estos residuos.

Para esto, se utilizaron los mismos cultivos de ATDC5 a diferentes tiempos, en ausencia o presencia de insulina, de los que previamente se extrajo RNA, y se sometieron al protocolo de extracción de proteína total. Mediante la técnica de *western blot*, se analizó la presencia de proteínas O-GlcNAc en cada uno de los tiempos de tratamiento.

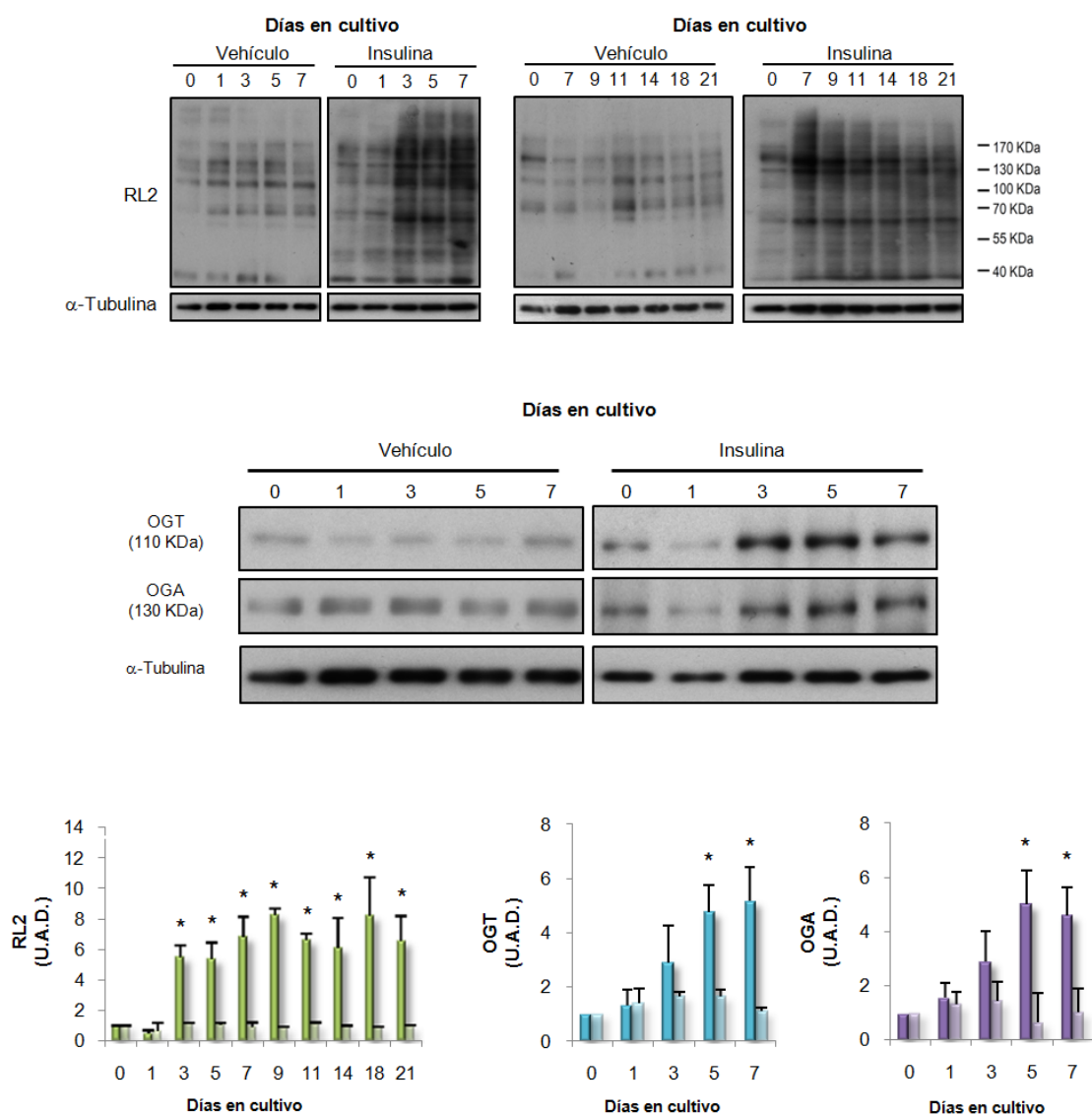
Nuestros experimentos demostraron que la diferenciación inducida por insulina aumentaba gradualmente la cantidad de estas proteínas, incremento que fue significativo desde el día 3 en comparación con la cantidad observada a día 0, mientras que la ausencia de insulina no produjo ningún cambio en la señal del RL2.

El mayor incremento de O-GlcNAc inducida por presencia de insulina se encontró en proteínas entre 110 y 170 kDa, y en proteínas alrededor de 55 a 70 kDa. El incremento en la cantidad de proteínas O-GlcNAc se mantiene alto desde el día 3 hasta el final del estudio, sin diferencias significativas entre los diferentes días de estudio.

Dado que comprobamos que este tipo de modificación proteica se modula durante el proceso de diferenciación hipertrófica, quisimos estudiar si la síntesis de las enzimas involucradas en el sistema de O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación se modificaba también durante la hipertrofia condrocitaria. Puesto que el anticuerpo RL2 mostraba un incremento significativo desde el día 3 sin diferencias en los tiempos posteriores hasta el final del estudio, centramos el análisis de la síntesis de enzimas en los primeros días de diferenciación de las células ATDC5.

Con este fin, usamos dos anticuerpos diferentes para detectar OGT y OGA, y mediante *western blot* analizamos su presencia en los mismos extractos proteicos donde habíamos testado previamente el nivel de O-GlcNAc con el anticuerpo RL2.

La diferenciación de ATDC5 mostró un incremento en la presencia de las enzimas clave que regulan la adición y eliminación del residuo de GlcNAc. La presencia tanto de OGT como de OGA, fue significativamente mayor desde el día 3 de diferenciación en comparación con el día 0, mientras que en ausencia de insulina no hubo modificación alguna. La expresión de las enzimas permanece incrementada hasta el fin del estudio. Dado que el incremento en la expresión de genes hipertróficos se conseguía alrededor del día 9 de cultivo, podemos decir que la activación del sistema de modificación O-GlcNAc precede a dicho incremento en los marcadores de diferenciación medidos.



**FIGURA 8.** Western Blot representativos de la presencia de proteínas O-GlcNAc, y las enzimas OGT y OGA durante la diferenciación de ATDC5 inducida con insulina. Las figuras superiores son representativas de los Western Blot, mientras las inferiores muestran el análisis por densitometría de 4 experimentos independientes. Las columnas muestran los valores medios  $\pm$  S.E.M. \*p < 0.05 vs. día 0 y vs. vehículo en el correspondiente día.

El estímulo necesario para conseguir la diferenciación hipertrófica en células ATDC5, la insulina, está directamente involucrado en el metabolismo de la glucosa.

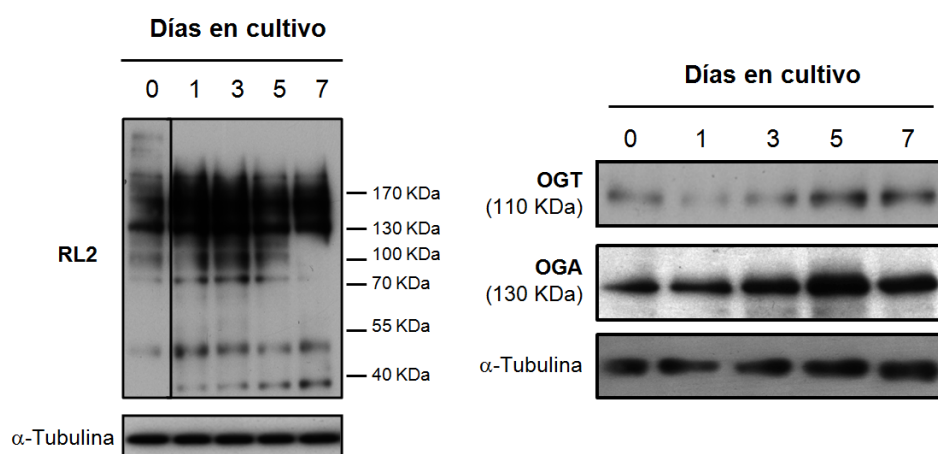
Así mismo, la ruta de síntesis de N-Acetilglucosamina (HBP), residuo que posteriormente se incorpora a las proteínas consiguiendo su modificación O-GlcNAc, depende directamente del flujo de glucosa que se internaliza en la célula.

Por este motivo, quisimos comprobar si un estímulo condrogénico, no directamente relacionado con el metabolismo de la glucosa, era capaz de modificar la cantidad de proteínas O-GlcNAc en células ATDC5 en ausencia de insulina.

El ácido ascórbico ha sido previamente descrito como agente diferenciador en células ATDC5 [222], por lo que estimulamos estas células con 50  $\mu\text{g/ml}$  de ácido ascórbico durante diferentes tiempos hasta 7 días.

De nuevo con los anticuerpos específicos RL2, OGT y OGA, mediante *western blot* se testó la cantidad de proteínas O-GlcNAc sintetizadas así como la síntesis de ambas enzimas.

El ácido ascórbico provocó un claro aumento en la cantidad de proteínas O-GlcNAc desde el día 1 de incubación. La síntesis de ambas enzimas, OGT y OGA fue también mayor en presencia de ácido ascórbico.



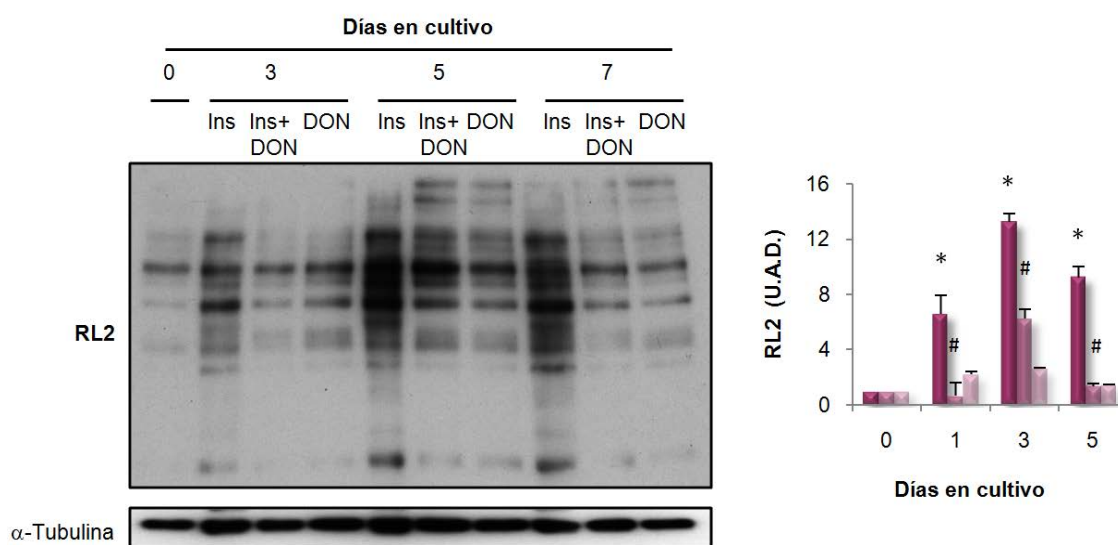
**FIGURA 9.** Estudios por *western blot* de proteínas O-GlcNAc, OGT y OGA en células ATDC5 tratadas con ácido ascórbico a diferentes periodos de tiempo. El tratamiento con ácido ascórbico en células ATDC5 conduce a un incremento en proteínas O-GlcNAc.

#### 4.III.C. Efecto de los niveles de O- $\beta$ -N-Acetilglicosilación sobre el perfil hipertrófico en células ATDC5.

Para analizar si la O-GlcNAc está intrínsecamente relacionado con la diferenciación hipertrófica condrocitaria o por el contrario es solo un epifenómeno, estudiaremos los efectos de disminuir los niveles de proteínas O-GlcNAc sobre la expresión de marcadores hipertróficos. Con este fin, haremos uso de un inhibidor de la GFAT-1 (enzima limitante de HBP), DON, el cual fue añadido al medio en presencia y ausencia de insulina.

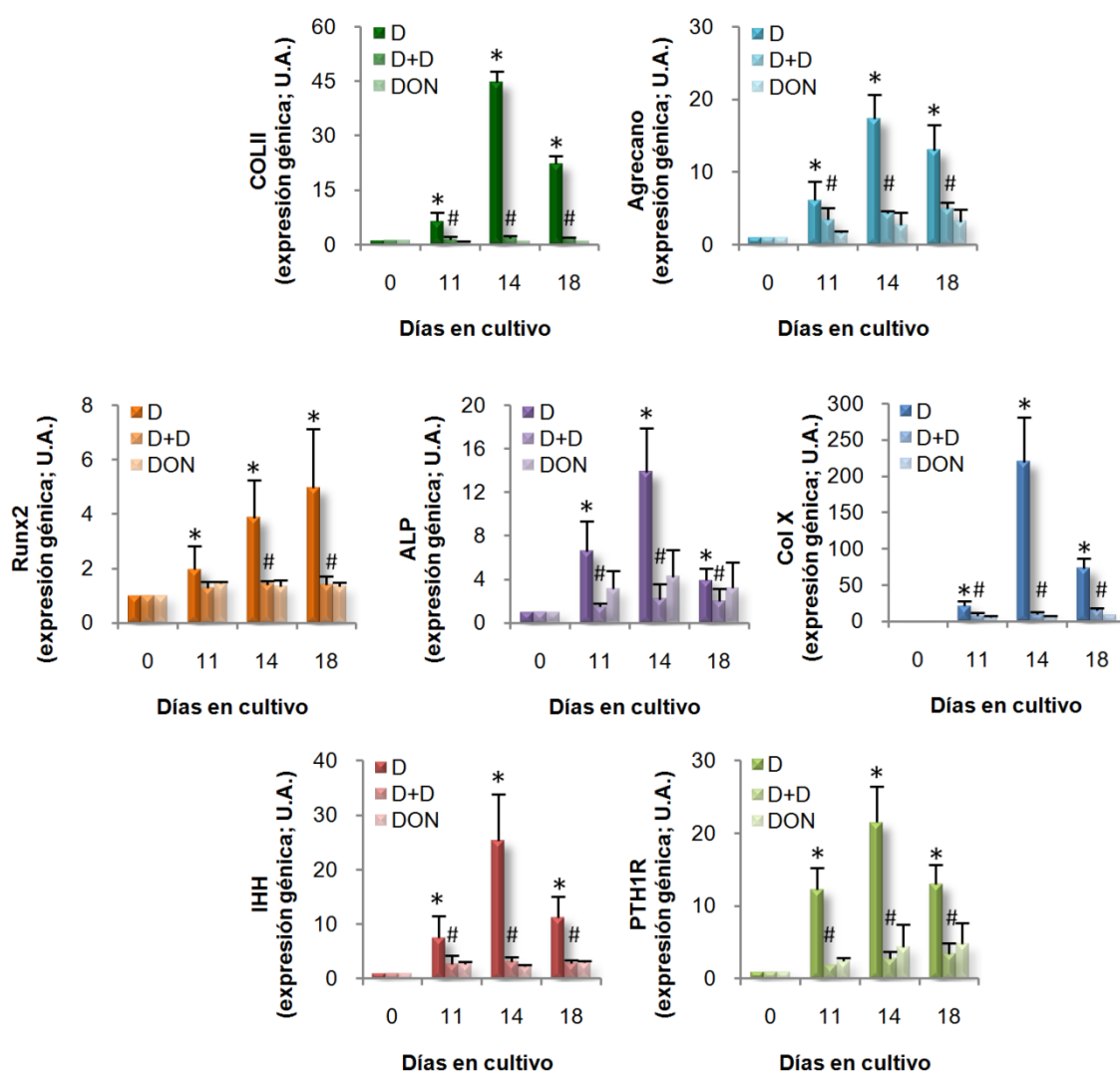
Primero se realizaron cultivos a diferentes tiempos hasta 7 días, para estudiar el efecto del inhibidor en el sistema O-GlcNAc, y posteriormente se prolongaron hasta 21 días para analizar la expresión de los marcadores de diferenciación.

Las medidas por western blot con el anticuerpo RL2 mostraron que la elevación de proteínas O-GlcNAc inducida por insulina fue significativamente bloqueada por el tratamiento con DON (Fig. 12). Estos resultados indican que el incremento en proteínas O-GlcNAc durante la diferenciación de ATDC5 sucede por activación de HBP.



**FIGURA 12.** Estudio por *western blot* de proteínas O-GlcNAc de células ATDC5 tratadas con insulina en ausencia (columnas opacas), o presencia (columnas semitransparentes) de DON. Las columnas transparentes indican el efecto del DON en ausencia de insulina. El panel de la izquierda muestra un *western blot* representativo y los paneles de la derecha el análisis densitométrico de 3 experimentos independientes. Los resultados se muestran como incremento respecto al día 0  $\pm$  SEM. \*p < 0.05 vs. día 0; # p < 0.05 vs. insulina al mismo tiempo.

Testamos entonces si la inhibición de la O-GlcNAc podría tener algún efecto en el incremento de los marcadores de diferenciación inducidos por insulina. Como se muestra en la figura 13, la presencia de DON prácticamente bloquea por completo el incremento en los marcadores de diferenciación inducidos por insulina.

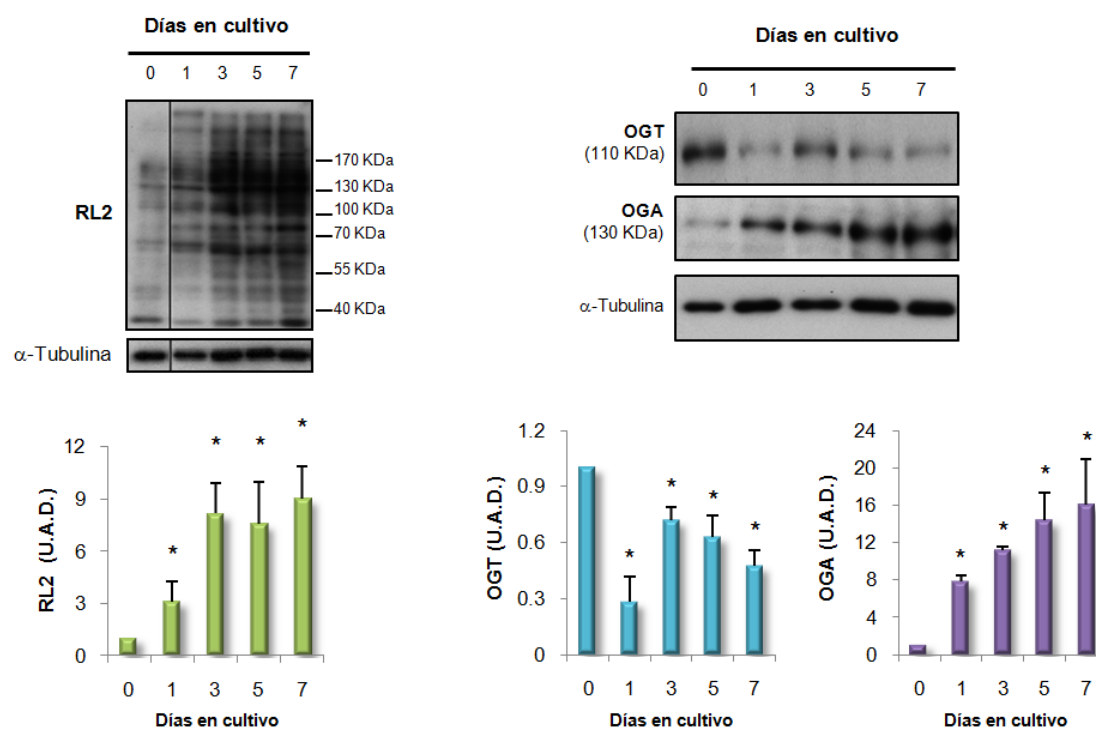


**FIGURA 13.** Expresión de marcadores de hipertrofia condrocitaria en células ATDC5 tratadas con insulina en ausencia (D), o presencia (D+D) de DON. Las columnas transparentes indican el efecto del DON en ausencia de insulina (DON). La expresión génica de marcadores de diferenciación Col II, Agrecano, IHH, PTH1R, Runx2, ALP, Col X y GAPDH se examinó por PCR a tiempo. Los resultados se muestran como incremento respecto al día 0  $\pm$  SEM. De 3 experimentos independientes \*p < 0.05 vs. día 0; # p < 0.05 vs. insulina al mismo tiempo.

Dado que durante la diferenciación hipertrófica, inducida tanto por insulina como por ácido ascórbico, se incrementan los niveles proteínas O-GlcNAc y además estas son estrictamente necesarias para este proceso, lo siguiente que examinamos fue si la

acumulación de O-GlcNAc *per se* era capaz de inducir la diferenciación de ATDC5. Para esto, las células ATDC5 se incubaron con el inhibidor selectivo de OGA, thiamet-G a la concentración de 1  $\mu$ M descrita en trabajos anteriores [205], añadido en sustitución de la insulina.

Primero se estudió el efecto del thiamet-G en la acumulación de proteínas O-GlcNAc y en la regulación de las enzimas responsables de esta modificación durante los 7 primeros días de cultivo en la línea celular ATDC5. Como podía esperarse, el thiamet-G induce un claro incremento en la acumulación de proteínas O-GlcNAc desde el día 1 de incubación en comparación con el día 0 (Fig. 10). En cuanto a la regulación enzimática, se demostró que el thiamet-G induce un incremento significativo en la síntesis de OGA desde el día 1 post-incubación, probablemente debido a un intento de la célula por recuperar la actividad bloqueada por inhibición de esta enzima.



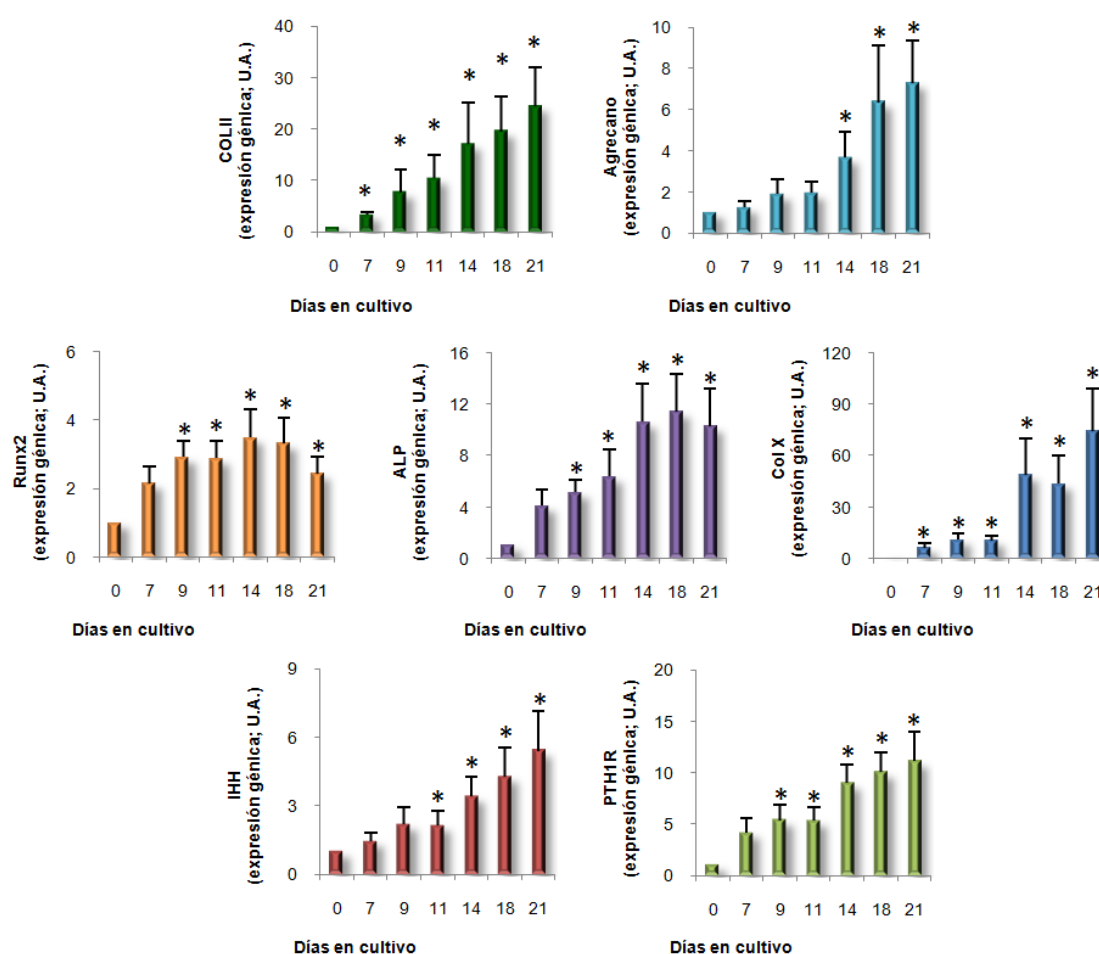
**FIGURA 10.** Estudios de *Western Blot* en células ATDC5 tratadas con thiamet-G 1 mM a diferentes tiempos. La imagen superior es representativa de los *Western Blot*, mientras la inferior muestra el análisis por densitometría de 4 experimentos independientes como aumento respecto al día cero en valores medios  $\pm$  S.E.M.

En contraste, la síntesis de OGT fue significativamente inhibida por el thiamet-G, como respuesta al exceso de proteínas O-GlcNAc presentes.



Una vez definida la actividad de este inhibidor en la línea celular ATDC5, se realizaron experimentos a los tiempos en los que previamente habíamos observado el incremento de expresión de marcadores hipertroáficos con el tratamiento con insulina.

Así pues, se incubaron células ATDC5 en presencia de thiamet-G a diferentes tiempos hasta un máximo de 21 días, y analizamos por PCR en tiempo real la expresión génica de los mismos genes medidos anteriormente.



**FIGURA 11.** Expresión génica de marcadores de hipertrofia condrocitaria en células ATDC5 tratadas con thiamet-G a diferentes tiempos. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  S.E.M. de la inducción de la expresión en comparación con el día 0 de 7 experimentos. \*p < 0.05 vs. día 0.

La presencia de este inhibidor en ausencia de insulina condujo a un incremento significativo en la expresión de los marcadores de diferenciación medidos: Col II, Agg, Runx2, ALP, Col X, IHH y PTHR1, en comparación con la expresión a día 0 (Fig. 11).

Estos incrementos fueron también significativamente mayores a los observados en los cultivos anteriormente tratados con vehículo, en los correspondientes tiempos de

incubación. Al compararlos con la expresión génica inducida por insulina, no se observaron diferencias significativas, probablemente debido a la desviación estándar de los experimentos, aunque la inducción por el tratamiento con thiamet-G parece menor que la observada con insulina (Fig. 7 y 11).

En conjunto estos datos indican que el aumento de proteínas O-GlcNAc durante la diferenciación hipertrófica no es un epifenómeno, sino que es un evento clave para este proceso. No solo la inhibición de la síntesis del donador para la O-GlcNAc inhibe directamente la expresión de marcadores de hipertrofia, sino que además un aumento de proteínas O-GlcNAc es capaz de inducir por sí mismo la expresión de estos marcadores.

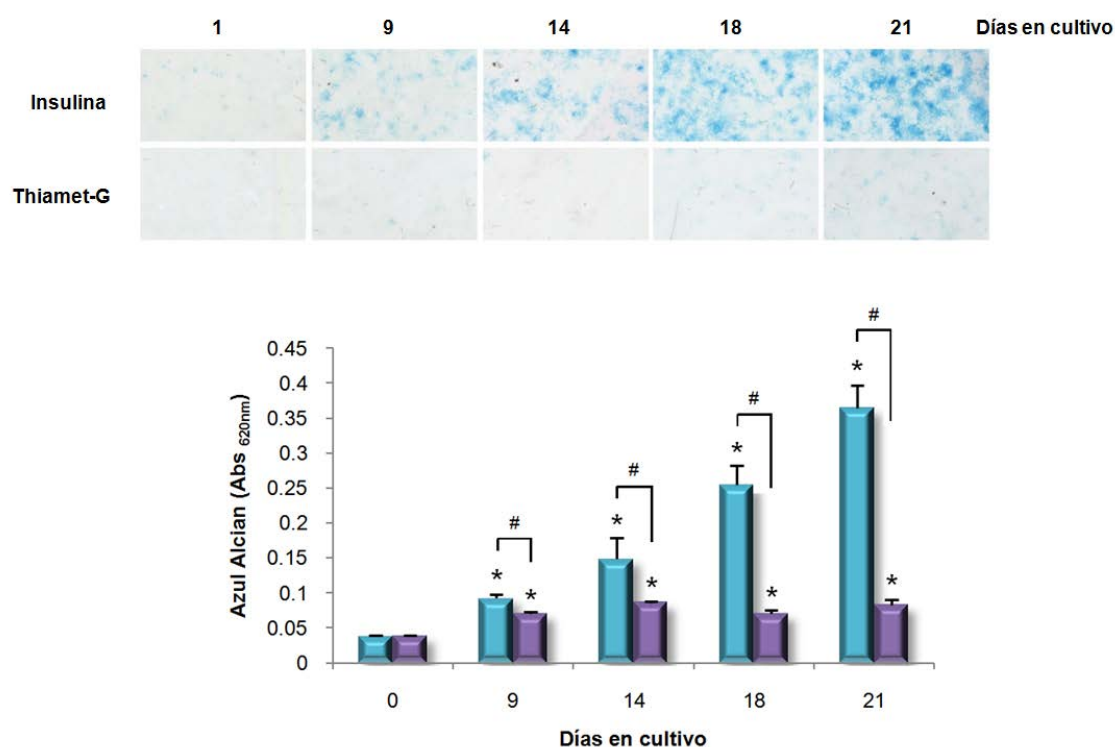
#### **4.III.D. Efectos de la acumulación de proteínas O-GlcNAc sobre el remodelado de la matriz.**

Nuestros experimentos demostraron que la acumulación de O-GlcNAc induce un perfil hipertrófico en base a la expresión de marcadores de diferenciación característicos de la hipertrofia condrocitaria. Es decir, el tratamiento de ATDC5 con thiamet-G produce una hipertrofia inducida por proteínas O-GlcNAc.

Además de la expresión de genes característicos, un aspecto importante del proceso de hipertrofia es el remodelado que sufre la matriz. Nuestros siguientes experimentos tuvieron como objetivo estudiar en mayor detalle los efectos que el thiamet-G puede tener sobre los procesos característicos que se dan en la MEC durante la hipertrofia condrocitaria.

Durante la osificación endocondral los condrocitos hipertróficos sintetizan proteoglicanos que formarán parte de la matriz extracelular. Por tanto, lo primero que se testó fue si el tratamiento con el inhibidor de la enzima OGA, era capaz de incrementar la síntesis de proteoglicanos, utilizando como referencia el tratamiento con insulina, usando como método de medida la tinción con Azul Alcian.

La presencia de insulina incrementó progresivamente el contenido de proteoglicanos en las células ATDC5 durante el tiempo de estudio. Las medidas de absorbancia mostraron significación estadística a partir del día 9, mismo día en el que se observó el aumento en la expresión de la mayoría de marcadores hipertróficos anteriormente medidos.

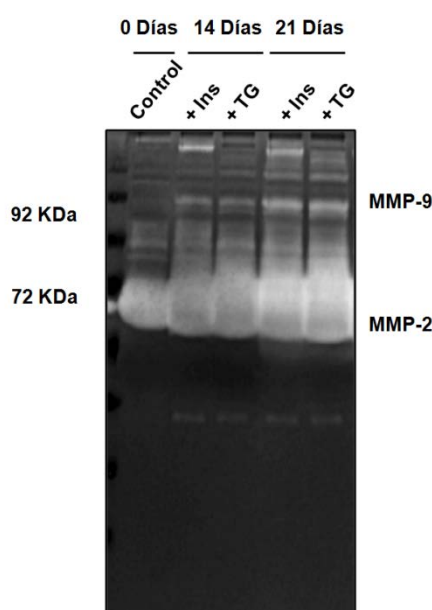


**FIGURA 14.** A, Tinción Alcian Blue de células ATDC5, después de 21 días de cultivo con insulina (barras azules) o thiamet-G (barras moradas). La figura inferior muestra la cuantificación de absorbancia a 620 nm. Las barras muestran las medias  $\pm$  S.E.M de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  vs. día 0; #  $p < 0.05$  vs. insulina al día correspondiente.

En contraste, solo se observó un ligero aumento de tinción en las células estimuladas con thiamet-G, que aunque fue significativamente diferente en comparación con el día cero a todos los tiempos medidos, también fue significativamente menor que el observado con insulina (Fig. 14).

Otra fase característica de la diferenciación condrocitaria es el remodelado enzimático de la matriz extracelular. La familia MMP de proteasas, la cual juega un papel principal en el remodelado y la degradación de la MEC, está involucrada en la conservación de la integridad de la MEC y la vascularización de la placa de crecimiento [223][224]. Un incremento en la actividad de MMP-2 y MMP-9 ha sido previamente relacionado con un incremento en la diferenciación de ATDC5 [225]. Nosotros estudiamos el efecto de la acumulación de O-GlcNAc en la actividad de MMP-2 y MMP-9 en los sobrenadantes de los condrocitos ATDC5 cultivados 14 y 21 días, en comparación con la actividad inducida por insulina.

Dado que ambas MMPs son gelatinasas, se realizaron zimografías con geles al 0.1% de gelatina para testar su actividad enzimática. De esta forma se detectaron las bandas de 92 y 72 kDa correspondientes a MMP-9 y MMP-2 respectivamente (Fig 15). La actividad de ambas MMPs fue mayor al día 14 y 21 en células diferenciadas en presencia de insulina que la observada a día 0. La acumulación de O-GlcNAc inducida por thiamet-G también conduce a un claro aumento en la actividad de estas MMPs en comparación con la actividad a día 0 en los dos tiempos testados. La inducción de estas MMPs fue similar a la inducida por insulina.



**FIGURA 15.** Zimografía en gelatina mostrando la presencia de MMP-9 y MMP-2 en el medio de células ATDC5 tratadas con 10 µg/ml insulina o 1 µM thiamet-G durante 14 o 21 días.

Nuestros resultados muestran que la acumulación de proteínas O-GlcNAc produce un remodelado enzimático de la matriz por activación de MMPs, pero no es capaz de estimular la síntesis de proteoglicanos en la medida en la que se producen durante la diferenciación inducida por insulina.

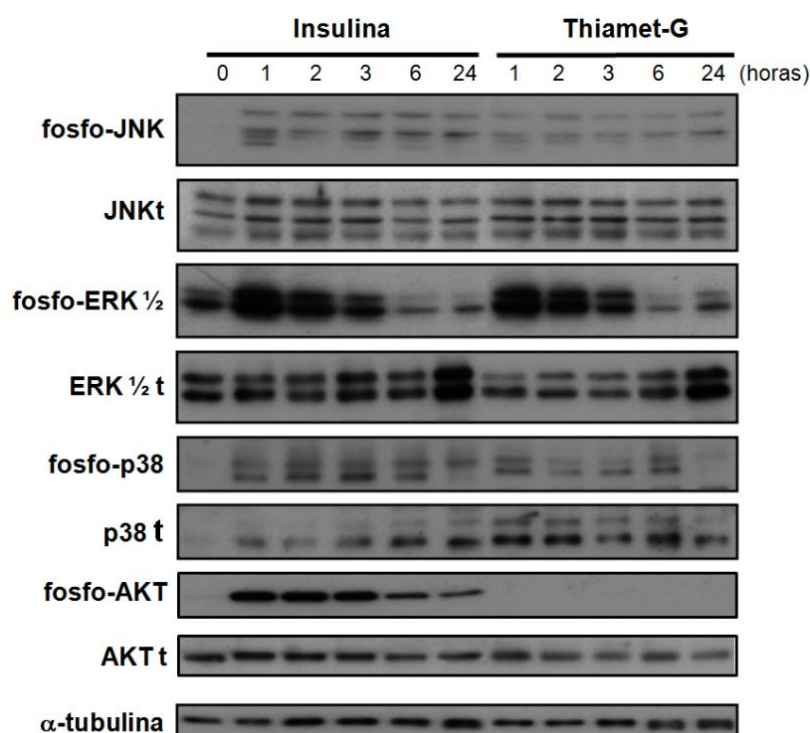
#### **4.III.E. Activación de rutas moleculares involucradas en hipertrofia condrocitaria por acumulación de proteínas O-GlcNAc.**

Para poder establecer si los mediadores moleculares que se inducen durante la diferenciación de ATDC5 inducida por insulina eran o no similares a los inducidos por

thiamet-G, examinamos la activación de diferentes quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y de la molécula AKT, las cuales están involucradas en las rutas de traducción de señal y han sido relacionadas con gran variedad de eventos celulares, como diferenciación, proliferación, migración y apoptosis [226][227][228].

Para esto, se compararon los efectos del thiamet-G con los de la insulina a diferentes tiempos de incubación durante las primeras 24 horas de diferenciación.

Las señales obtenidas por *western blot* mostraron que el thiamet-G induce la fosforilación de JNK, ERK y p38, en comparación con la activación observada a las 0 horas, con un pico alrededor de 1-2 horas para los 3 mediadores (Fig 16). La insulina también activa la fosforilación de estas tres moléculas. Sin embargo, el thiamet-G no indujo la fosforilación de AKT, mientras la insulina mostró una clara inducción.



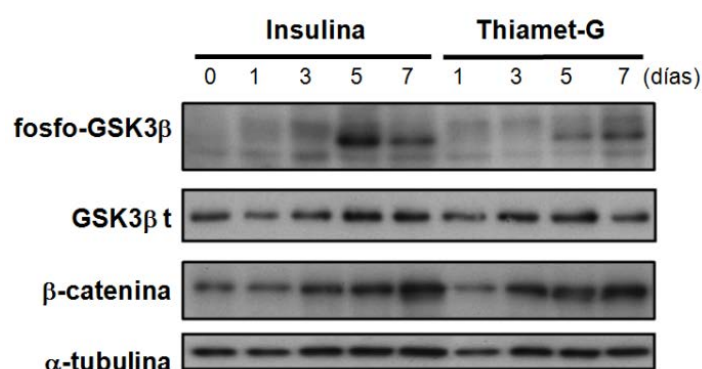
**FIGURA 16.** Análisis por *Western blot* de la activación de MAPKs y Akt1/2/3 en precondrocitos ATDC5 cultivados con 10 µg/ml insulina o 1 µM thiamet-G durante los tiempos indicados.

Además, investigamos si alguna molécula por debajo de la cascada de las MAPKs y AKT, como la glucógeno sintasa kinasa-3β (GSK3β), ampliamente asociada con un aumento de diferenciación en condrocitos [229], podía ser activada con tratamiento de insulina o thiamet-G. La fosforilación de GSK3β supone su inactivación evitando así la

fosforilación, (y por tanto degradación), de  $\beta$ -catenina. Por este motivo quisimos también comprobar si la fosforilación de la primera molécula aumentaba la síntesis de la segunda.

De nuevo estos estudios se realizaron por la técnica de *western blot* usando los anticuerpos específicos para las proteínas mencionadas.

La diferenciación, tanto con insulina como con thiamet-G, aumentó claramente la fosforilación de GSK3 $\beta$  (Fig. 17). Además, esta inactivación de GSK3 $\beta$  inducida por insulina o thiamet-G, fue asociada con incremento en los niveles de  $\beta$ -catenina

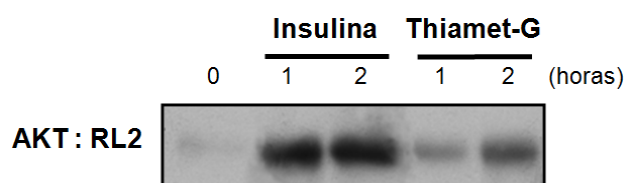


**FIGURA 17.** Análisis por *western blot* de la activación de GSK3 $\beta$  y síntesis de  $\beta$ -catenina en precondrocitos ATDC5 cultivados con 10  $\mu$ g/ml insulina o 1  $\mu$ M thiamet-G durante los tiempos indicados.

#### **4.III.F. Estudio de la O-GlcNAc de una molécula activada en rutas de transducción de señal durante la hipertrofia condrocitaria.**

Los anteriores resultados muestran que en nuestra diferenciación hipertrófica inducida por proteínas O-GlcNAc se activan rutas de la misma forma que se activan en la hipertrofia “clásica” inducida por insulina. Sin embargo, la estimulación con thiamet-G falló en la activación de la molécula de AKT por fosforilación. Dado que la activación de la ruta de AKT ha sido previamente asociada tanto con su fosforilación como con su dinámica modificación O-GlcNAc [158], estudiamos si en la hipertrofia inducida por insulina y por thiamet-G se regula esta última modificación de AKT. Los extractos de proteínas de células tratadas con insulina o thiamet-G fueron inmunoprecipitados con un

anticuerpo anti-AKT, y las proteínas unidas a las bolas magnéticas fueron eluidas y detectadas por *western blot* con el anticuerpo RL2.



**FIGURA 18.** Análisis de la modificación de AKT por O-GlcNAc mediante inmunoprecipitación. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo de Akt total, y después las proteínas eluidas se blotearon con el anticuerpo RL2 en células ATDC5 cultivadas con 10  $\mu\text{g/ml}$  insulina o 1  $\mu\text{M}$  thiamet-G durante los tiempos indicados.

Como puede observarse en la figura 18, tanto las células tratadas con insulina como las tratadas con thiamet-G mostraron un incremento en la modificación O-GlcNAc de AKT, en comparación con las células no diferenciadas. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la diferenciación con insulina induce simultáneamente la fosforilación y O-GlcNAc de AKT, mientras que el thiamet-G induce solamente su O-GlcNAc.

## ***5. DISCUSIÓN***



## 5.1. PERFIL DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS O-GLCNAC EN EL CARTÍLAGO SANO Y ARTRÓSICO.

El estudio de proteínas en diferentes estados de fosforilación proporciona conocimiento sobre las funciones de esta modificación post-traducciona en mecanismos implicados en respuestas biológicas. De manera similar, la identificación de un perfil de proteínas O-GlcNAc en un determinado estado celular nos dará información sobre el papel específico de esta modificación. Las proteínas reguladoras, normalmente las más interesantes en estudios proteómicos, suelen presentarse en un número de copias muy bajo. En el caso de estudios de modificaciones post-traduccionales, el inconveniente de la baja abundancia relativa es particularmente problemático. La estequiometría del grupo fosfato o el de GlcNAc en una determinada proteína es pequeña pero funcionalmente muy significativa. Así, es necesario utilizar técnicas que permitan reducir la complejidad de la muestra y enriquecerla en proteínas específicamente modificadas. En el caso de O-GlcNAc, una de las técnicas más usadas para el enriquecimiento es la lectina WGA que reconoce residuos de GlcNAc terminales. Este método de enriquecimiento resultó eficaz en otros análisis que revelaron proteínas que no hubieran podido ser identificadas en mezclas crudas complejas [230–232]. La mejora en los últimos años de las herramientas disponibles para el estudio de O-GlcNAc hace que el descubrimiento de nuevas proteínas susceptibles de O-GlcNAc sea exponencial. La cromatografía de afinidad a lectina permitió la identificación de más de 142 sitios de O-GlcNAc en 62 proteínas de células madre embrionarias de ratón [233] y un estudio reciente en cerebro ha descubierto 168 nuevas proteínas que no se sabía que se modificaban por O-GlcNAc [234].

A pesar de que el estudio de proteínas O-GlcNAc está cobrando gran relevancia en los últimos años, su análisis en el tejido articular está completamente inexplorado. Al igual que ha sucedido en otras enfermedades crónicas como Alzheimer, diabetes o cáncer, el estudio de las proteínas que se modifican O-GlcNAc en el cartílago durante el desarrollo de la artrosis, permitirá elucidar mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de la enfermedad.

Nuestros resultados muestran que un gran número de proteínas O-GlcNAc presentes en el cartílago sano están relacionadas con el citoesqueleto. Además, ninguna de las proteínas O-GlcNAc exclusivas de OA participa en este proceso biológico. La reorganización del citoesqueleto en los condrocitos es clave para la respuesta a

diferentes estímulos y ha sido relacionada con el proceso de condrogénesis y la hipertrofia condrocitaria que se da en la artrosis [235–242]. Un estudio reciente ha demostrado que existe una disminución en la expresión de genes relacionados con el citoesqueleto durante el desarrollo de la OA [243]. Nuestros resultados muestran por primera vez la importancia que la O-GlcNAc de proteínas del citoesqueleto tiene en la conservación del condrocito en su estado fisiológico. El cartilago artrósico presenta menos proteínas O-GlcNAc relacionadas con el citoesqueleto en comparación con el tejido sano. Análisis proteómicos para identificación de proteínas O-GlcNAc en otras enfermedades crónicas también muestran un perfil diferencial donde las proteínas del citoesqueleto están alteradas [244]. La presencia de isoformas hiper-O-GlcNAc de Tau detectadas en Alzheimer se correlaciona con defectos en el citoesqueleto de microtúbulos [245–247] y la O-GlcNAc de miofilamentos cardiacos está asociada con la regulación de su función contráctil [160]. Muchas características del citoesqueleto parecen estar reguladas por O-GlcNAc. La O-GlcNAc de tubulina inhibe su polimerización a microtúbulos [248] y la adición de residuos O-GlcNAc a queratinas, talina o vinculina puede influir en las uniones del citoesqueleto y el ensamblaje de filamentos [249–252]. Además, la despolimerización inducida del citoesqueleto de microtúbulos resulta en la hiper-O-GlcNAc de otros elementos del citoesqueleto como queratinas [253]. Curiosamente, se ha mostrado que la sobreexpresión tanto de OGT como de OGA conlleva la desorganización del citoesqueleto de microtúbulos y de actina [254].

Uno de los procesos que regula la O-GlcNAc de proteínas del citoesqueleto es la citoquinesis durante la división celular [147]. La pérdida cualitativa de proteínas O-GlcNAc del citoesqueleto en el cartilago artrósico sugiere que esta modificación podría estar implicada en el bloqueo activo fisiológico al que está sometido condrocito articular, el cual se caracteriza por una baja tasa de división celular. La disminución de residuos O-GlcNAc en el citoesqueleto podría contribuir a la pérdida de ese bloqueo, desencadenando así el fenotipo proliferatelo característico del condrocito artrósico.

El citoesqueleto del condrocito está formado principalmente por microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios de vimentina. La vimentina es una proteína mucho más abundante en condrocitos que en otras células mesenquimales [255] y se expresa constitutivamente en condrocitos adultos [256]. Aunque la O-GlcNAc de vimentina ha sido descrita anteriormente [154], nuestros datos demuestran por primera vez que esta proteína se encuentra O-GlcNAc modificada, al menos en

parte, tanto en el cartílago sano como en el artrósico. La vimentina es importante para la estabilización de la estructura celular dado que conecta varios componentes citoplásmicos como el núcleo, el retículo endoplásmico y la mitocondria, y juega un papel principal en el soporte y anclaje de la posición de cada orgánulo en el citoplasma [257,258]. Además, se ha descrito un papel de la vimentina implicado en la diferenciación celular [259]. De hecho, esta proteína puede regular la condrogénesis de células progenitoras multipotentes derivadas de la médula ósea en humanos adultos [260]. Con estos datos previos, nuestros resultados podrían sugerir que la O-GlcNAc de vimentina está implicada en el proceso de diferenciación hipertrófica que recupera el condrocito durante la artrosis.

La vimentina tiene también una función mecánica en el mantenimiento de la rigidez del condrocito y esta función está alterada en los condrocitos del cartílago artrósico [261]. Varios estudios demuestran una relación entre la pérdida de la red de vimentina y el desarrollo de la OA [262–265]. Estudios futuros determinarán si la disminución de esta proteína en la OA está relacionada con cambios cuantitativos en su modificación O-GlcNAc.

Nuestro análisis reveló también la importancia que la modificación O-GlcNAc tiene en la adhesión celular y la organización de la MEC del cartílago sano.

Las adhesiones focales median la interacción entre las proteínas del citoesqueleto y la MEC [266]. La cara externa del contacto focal incluye receptores específicos para fibronectina y vitronectina, dos componentes comunes de la MEC, mientras que en la cara citoplásmica de las adhesiones focales, varias proteínas median la interacción con los filamentos de actina del citoesqueleto.

Curiosamente, nuestro estudio identifica la O-GlcNAc de vitronectina solo en el cartílago sano, y aunque también se detectó la modificación con residuos de GlcNAc en fibronectina, ésta aparece en ambos tipos de cartílago. De la misma forma, ambas muestras muestran O-GlcNAc de actina, aunque corresponden a diferentes tipos de actina. Esto pone de manifiesto el papel que la O-GlcNAc tiene en la regulación de la adhesión celular en el cartílago. Durante la artrosis los condrocitos sufren modificaciones en su adhesión celular, principalmente cuando se inicia el proceso de angiogénesis por el cual se rompen proteínas de unión para permitir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos [267]. Así, probablemente la pérdida de O-GlcNAc de vitronectina esté implicada en el proceso de destrucción de uniones celulares facilitando la progresión de la OA.

A pesar de que la O-GlcNAc se concibe clásicamente como un sistema intracelular, todos nuestros datos apuntan a que la O-GlcNAc puede estar implicada en procesos característicos de la adhesión celular y regulación de la MEC. Se ha demostrado durante años que la O-GlcNAc se da en numerosas proteínas nucleares y citoplásmicas, pero existen datos recientes que muestran la posibilidad de un nuevo papel de esta modificación post-traducciona [268]. Varios estudios muestran una O-GlcNAc extracelular en los receptores Notch y Dumpy [134,269]. La enzima que une GlcNAc a Notch y que no está relacionada genéticamente con OGT, reside en el retículo endoplásmico dentro de la ruta de secreción y se ha denominado OGT específico de dominio EGF (EOGT) [134]. EOGT parece estar conservada desde *Drosophila* hasta mamíferos [269,270]. Sin embargo, se ha sugerido que esta EOGT tiene otros sustratos, como varias proteínas de membrana, y que por tanto interviene en la interacción de receptores con la MEC [234]. La importancia de esta modificación dentro de la MEC ha sido demostrada en *Drosophila*, donde la pérdida de EOGT provoca defectos en la MEC apical [269]. Varias proteínas importantes en la MEC del cartílago aparecen O-GlcNAc modificadas en nuestro estudio. La matrilina-3, encontrada exclusivamente en su forma O-GlcNAc en el cartílago sano, pertenece a la familia de proteínas matrilinas de matriz extracelular y esta expresada sobretodo en cartílago [271]. Está involucrada en la orientación y el alineamiento celular y proporciona sitios de unión para fomentar la adhesión celular y el crecimiento [272]. Se ha demostrado que la matrilina-3 está también relacionada con algunas enfermedades del cartílago y mutaciones en matrilina-3 humana pueden causar condrodisplasias y un inicio precoz de OA [273]. Un estudio demuestra que la matrilina-3 puede activar la expresión de genes asociados a OA en condrocitos primarios humanos [274]. Otra proteína encontrada en su forma O-GlcNAc exclusivamente en donantes sanos es el agregano, el cual es ampliamente conocido como componente fundamental en la matriz fisiológica del cartílago. Así, nuestros resultados encajan con datos previos, y demuestran por primera vez que la regulación de la adhesión celular y los procesos de conservación o destrucción de la MEC del condrocito pueden estar regulados por O-GlcNAc en el proceso de la OA.

Nuestra técnica para la selección de proteínas O-GlcNAc, por afinidad a WGA, presenta el inconveniente de que este tipo de lectina también se puede unir a proteínas modificadas por sialización. Sin embargo, dadas las escasas herramientas disponibles para el estudio de O-GlcNAc, la cromatografía de afinidad a WGA se presenta como una de las mejores opciones. Además, existe una base de datos (dbOGAP: "Database of

O-GlcNAcylated Proteins and Sites”) que recoge las proteínas O-GlcNAc identificadas hasta el momento, en la cual puede consultarse si las proteínas de nuestro análisis proteómico han sido previamente descritas como susceptibles de ser O-GlcNAc modificadas. Sin embargo, un estudio en profundidad de la literatura nos ha mostrado que esta base de datos no está completa, y que algunas proteínas de las que se ha descrito su O-GlcNAc recientemente, no aparecen. Este es el caso de la trombospondina-1 que hemos identificado en el cartílago sano. La base de datos dbOGAP nos dice que esta proteína no es susceptible de modificarse por O-GlcNAc, pero revisando la literatura encontramos que el año pasado se describió que, entre otras modificaciones post-traduccionales, la trombospondina-1 puede O-GlcNAc su dominio extracelular [275]. Por otra parte, como hemos mencionado, los resultados de nuestro laboratorio están siendo pioneros en el campo de O-GlcNAc en la artrosis. Aunque muchos otros tejidos han revelado proteínas O-GlcNAc, nadie ha identificado este tipo de proteínas en cartílago. Por este motivo, dbOGAP no incluye proteínas características del cartílago que se expresan exclusivamente en este tejido, como la proteína 1 de la capa intermedia del cartílago o la proteína oligomérica de la matriz del cartílago. Por tanto, no podemos asegurar que las proteínas exclusivas de este tejido que revela nuestro estudio de O-GlcNAc tengan realmente sitios de modificación por O-GlcNAc. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de nuevas herramientas mejoradas para el estudio de O-GlcNAc. Nuestro laboratorio continuará trabajando en este aspecto para profundizar en el conocimiento de las proteínas que pueden modificarse por O-GlcNAc en el cartílago.

En conjunto, nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia de la O-GlcNAc en el fenotipo característico del condrocito en cada situación. Si atendemos a la identificación de proteínas O-GlcNAc en cartílago OA, vemos una importante disminución cualitativa respecto al cartílago sano. La pérdida de O-GlcNAc en proteínas implicadas en procesos tan importantes para el cartílago como la conservación del citoesqueleto del condrocito o la matriz extracelular, parece ser determinante en los cambios fisiopatológicos que se dan en la artrosis. Además de la pérdida de O-GlcNAc en los procesos predominantes de la biología del condrocito sano, en la OA se observa una ganancia en O-GlcNAc de proteínas involucradas en procesos predominantes de la patología. Los datos previos de nuestro laboratorio mostraron que en la OA existe un aumento cuantitativo neto de proteínas O-GlcNAc. Este hecho nos sugiere que la

ganancia de O-GlcNAc en procesos patológicos durante la artrosis es mayor en cantidad a la pérdida de O-GlcNAc en procesos fisiológicos del condrocito sano.

Los condrocitos articulares están continuamente sometidos a un bloqueo activo de su fenotipo, por el cual mantienen las condiciones fisiológicas del cartílago sano. Durante la OA parece perderse este bloqueo activo, y el condrocito articular se des-diferencia y entra en un proceso que recuerda a la cascada de eventos que se da en la osificación endocondral, recuperando un fenotipo hipertrófico (revisado en [41,276]).

Nuestros resultados muestran una relación clara entre la O-GlcNAc y el fenotipo característico del condrocito en un determinado estado del cartílago.

Por lo tanto, nuestros siguientes estudios están dirigidos a determinar si existe relación entre la O-GlcNAc y el fenotipo del condrocito característico de la artrosis, pudiendo estar la modificación O-GlcNAc de proteínas involucrada en la diferenciación hipertrófica del condrocito.

## **5.II. INFLUENCIA DE PROTEÍNAS O-GLCNAC EN LA DIFERENCIACIÓN HIPERTRÓFICA CONDROCITARIA *IN VIVO*.**

Con el fin de analizar la influencia que las proteínas O-GlcNAc pueden tener en el proceso de diferenciación hipertrófica del condrocito, utilizamos un modelo *in vivo* donde se da este fenotipo hipertrófico. La placa de crecimiento incluye condrocitos quiescentes llamados “de reserva”, así como condrocitos en fase de proliferación, de hipertrofia y de calcificación. Todos estos estados celulares hacen que la placa de crecimiento sea un buen modelo para estudiar los mecanismos que sufre el condrocito articular desde su des-diferenciación de célula quiescente hasta la recuperación del fenotipo hipertrófico que sucede en la artrosis. Así, estudiamos el efecto de la acumulación de O-GlcNAc *per se* en el proceso de diferenciación hipertrófica condrocitaria, induciendo la acumulación de proteínas O-GlcNAc con la administración del inhibidor de OGA, thiamet-G, a ratones jóvenes. El thiamet-G y otras tiazolinas han sido previamente empleadas para estudiar el efecto del incremento en la O-GlcNAc evitando los efectos tóxicos de otros inhibidores de OGA y con mejores resultados que estudios que sobreexpresan OGT [204]. Además, se ha demostrado que la administración de inhibidores de OGA mejorados como las tiazolinas o 6-Acetamido-6-desoxi-castanospermina *in vivo*, parece no provocar insulino-resistencia o perturbar la glucohomeostasis ([204,206] Vocadlo DJ (datos no publicados)). Nuestros datos

muestran que la administración de thiamet-G induce un incremento significativo en la altura de la placa endocondral, debido a un incremento en la longitud de la zona hipertrófica. Sin embargo, la zona proliferativa no parece estar alterada y tampoco encontramos un incremento paralelo de la longitud total de la tibia. En base a nuestros experimentos, no somos capaces de determinar si un tratamiento más prolongado en el tiempo con thiamet-G podría inducir un incremento en la longitud de la tibia. Además, no podemos excluir la posibilidad de que el efecto del thiamet-G en la diferenciación de condrocitos no sea seguido de una inducción de otros eventos que participen en la elongación del hueso, como la inducción de la vascularización o el proceso de calcificación.

En resumen, la administración *in vivo* de thiamet-G provocó un incremento en la altura de la placa endocondral de ratones debido a un efecto específico sobre la fase de diferenciación hipertrófica condrocitaria. En conjunto, estos resultados indican que la O-GlcNAc parece jugar un papel vital en la condrogénesis, y que una mayor comprensión de la actividad de OGT y OGA proporcionará nuevas vías para investigar el control de la formación, crecimiento, metabolismo y reparación del cartílago.

### **5.III. MECANISMOS RELACIONADOS CON LA O-GLCNAC DE PROTEÍNAS DURANTE LA HIPERTROFIA CONDROCITARIA.**

Nuestros estudios *in vivo* demostraron que un incremento global en la O-GlcNAc de proteínas influye en el desarrollo de un fenotipo hipertrófico en el condrocito. Así, quisimos analizar en profundidad cómo la O-GlcNAc de proteínas afecta a las características y los mecanismos implicados en la diferenciación hipertrófica condrocitaria. Estos estudios se realizaron *in vitro* sobre la línea de condrocitos pre-hipertróficos ATDC5. En este trabajo se demuestra por primera vez que la diferenciación de ATDC5 inducida por insulina se produce después de un aumento en la acumulación de proteínas O-GlcNAc. La acumulación de este tipo de proteínas modificadas fue en paralelo a un aumento de la presencia de las enzimas responsables del ciclo O-GlcNAc: OGT y OGA. Hemos demostrado que en ausencia de insulina, la inhibición de OGA induce un incremento en la O-GlcNAc junto al aumento de varios marcadores de diferenciación.

El aumento en la O-GlcNAc de proteínas asociado con la diferenciación hipertrófica que hemos demostrado, abarca un amplio número de proteínas. Análisis proteómicos

han identificado cerca de mil proteínas susceptibles de modificarse por O-GlcNAc [1], pertenecientes a casi todas las clases funcionales [126,278]. En nuestro estudio *in vitro* no hemos identificado que proteínas diana específicas de modificación O-GlcNAc están funcionalmente unidas a los mecanismos de diferenciación hipertrófica. Sin embargo, se conoce que muchas de las moléculas principales determinantes de función en estos procesos, son altamente modificables con O-GlcNAc. Se ha demostrado la modificación con O-GlcNAc de diferentes proteínas involucradas en la vía Wnt, como placoglobina [279],  $\beta$ -catenina [157], o cAMP-CREB (Elemento de respuesta de unión a proteína); además de quinasas dependientes de calcio/calmodulina [156], y fosfatidilinositol 3-kinasa/Akt [162]. Encontramos un especial incremento en la O-GlcNAc de proteínas alrededor de 110-130 kDa de peso. Resultados similares han sido descritos en la O-GlcNAc en corazones de ratas diabéticas [175]. Además observamos un claro incremento en la O-GlcNAc de proteínas entorno a los 55-70 kDa, en la línea de resultados anteriores en el corazón de ratones diabéticos [280].

La diferenciación de la línea celular condrogénica ATDC5 es típicamente inducida por exposición de las células a insulina a través de la estimulación de los receptores de IGF y de insulina [46], la cual impulsa la captación y el uso de la glucosa [281]. Los condrocitos proliferativos y los que están en fase temprana de hipertrofia acumulan glucógeno que se empleará durante la fase de maduración [281,282]. Por tanto, parece concebible que la O-GlcNAc, la cual ha sido descrita como sensor de nutrientes que conecta respuestas celulares con el estado nutricional de la célula [136,191], pueda ser modificada durante la diferenciación de ATDC5.

El aumento de O-GlcNAc global inducida por insulina, y la relación entre resistencia a insulina y alteraciones de O-GlcNAc han sido ampliamente estudiadas, especialmente en procesos asociados con diabetes y desórdenes cardiovasculares [136,191]. Algunos estudios han mostrado que el incremento de O-GlcNAc puede moderar la respuesta a insulina inhibiendo la vía de Akt en tejidos diana de la insulina, como adipocitos y células musculares. [178,283–285]. Sin embargo, en otros sistemas se ha demostrado que un incremento en la O-GlcNAc potencia la señalización de la insulina [286,287]. En línea con nuestros datos, también se ha demostrado que la diferenciación de preadipocitos está inducida a través de un incremento en la modificación de O-GlcNAc en proteínas [259], mientras la diferenciación de adipocitos puede bloquearse inhibiendo la HBP [288]. Hasta la fecha no se han publicado estudios acerca de la regulación de incorporación de residuos O-GlcNAc en condrocitos articulares o



hipertróficos. Recientes datos de nuestro laboratorio revelan que también hay una acumulación de proteínas O-GlcNAc en el cartílago de pacientes humanos artrósicos [214]. Extraordinariamente, algunas características de la artrosis -proliferación de condrocitos articulares, expresión génica de marcadores de diferenciación, síntesis de MMP y remodelado de la matriz- se asemejan al proceso de diferenciación de condrocitos durante la EO [289,290].

Hemos demostrado que la acumulación de proteínas O-GlcNAc inducida por thiamet-G provocó un incremento en los genes de marcadores de diferenciación y en la actividad de MMP-2 y MMP-9 en las células condroprogenitoras ATDC5, lo que se asemeja al efecto de la insulina. Encontramos pequeñas diferencias entre insulina y thiamet-G en la intensidad de la inducción de los marcadores de diferenciación, y una clara diferencia en la activación de síntesis de proteoglicanos, al menos en la medida de la tinción de Azul Alcian.

Además, el perfil de fosforilación de MAPK inducido por ambos tratamientos fue prácticamente el mismo: tanto la insulina como el thiamet-G inducían un incremento en p-p38, p-Erk1/2 and p-JNK, en la línea de anteriores datos en otras líneas celulares [291,292] Sin embargo, el thiamet-G no induce la fosforilación de Akt, como se ha descrito anteriormente con otros inhibidores de OGA [162]. Resulta interesante la existencia de datos previos que demuestran que la síntesis de proteoglicanos inducida por insulina en condrocitos necesitaría la fosforilación de Akt [293]. Esto justifica el hecho de que el thiamet-G no sea capaz de incrementar la tinción de Azul Alcian en la misma medida que la insulina, dado que no induce la fosforilación de AKT. Observando las rutas de activación de GSK3 $\beta$  y  $\beta$ -catenina, también observamos que la acumulación de O-GlcNAc repetía de forma exacta el efecto de la insulina en los condrocitos pre-hipertróficos ATDC5.

También estudiamos si algún mediador específico de diferenciación era diana de O-GlcNAc durante la diferenciación condrogénica. Como ha sido descrito, hay una extensa relación entre la O-GlcNAc y la fosforilación de AKT que regula su señalización [158,162]. Fuimos capaces de detectar cambios en la O-GlcNAc de AKT inducidos tanto con insulina como con thiamet-G. Como demuestran nuestros datos, la fosforilación y la O-GlcNAc de AKT pueden ser simultáneamente inducidas, en la línea de resultados previamente publicados [162]. Además, la O-GlcNAc de AKT fue incluso más intensa cuando su fosforilación estaba activada, como es el caso de la diferenciación inducida por insulina. El efecto de la O-GlcNAc de AKT en cuanto a su

actividad enzimática o su localización celular, está todavía en discusión [158,162,286], y serán necesarios más experimentos para describir el efecto específico de esta modificación en la diferenciación de condrocitos.

En conjunto, y sin perder de vista las ligeras diferencias observadas entre una hormona de crecimiento como es la insulina, y un inhibidor específico de OGA, como es el thiamet-G, nuestros datos sugieren que la acumulación de proteínas O-GlcNAc puede ser el mecanismo celular para la diferenciación de condrocitos.

Entre los diferentes factores que pueden ser responsables del incremento en la O-GlcNAc observada durante la diferenciación condrocitaria inducida por insulina, hemos demostrado que el incremento en la síntesis de OGT, la enzima responsable de este tipo de modificación, es potencialmente la responsable de este efecto. El incremento de la presencia de esta enzima ha sido asociado con un incremento en esta modificación post-traducciona l tanto en respuesta a estrés agudo [169,294], como en respuesta a un daño crónico [295]. Además, también hemos observado un incremento en la presencia de la enzima responsable de la eliminación del residuo O-GlcNAc, OGA, durante la hipertrofia de ATDC5. Nuestros resultados están en línea con datos recientemente publicados, sugiriendo que bajo ciertas condiciones, OGT y OGA pueden actuar en tándem para regular la señal O-GlcNAc dentro de la célula [295,296].

Resulta interesante que el incremento global de O-GlcNAc en respuesta a estrés agudo parece depender de la inducción de OGT, así como un descenso en la presencia de OGA [294].

En contraste, en respuesta a un estímulo crónico, ambas enzimas parecen ser reguladas en la misma dirección. El incremento en proteínas O-GlcNAc en hipertrofia cardíaca humana se ha asociado con un incremento en la síntesis tanto de OGT como de OGA [295], y nosotros obtuvimos los mismos resultados para el incremento en las proteínas O-GlcNAc en cartílago humano artrósico [214]. Curiosamente, la regulación en la misma dirección de OGT y OGA ha sido también descrita en estudios crónicos, cuando el resultado es un descenso global en la O-GlcNAc de proteínas, donde el autor muestra un descenso en la síntesis de ambas enzimas [296]. De hecho, ha sido descrito que las células “OGT null” también disminuyen su expresión de OGA [297]. En este contexto, nuestros resultados de regulación de OGT y OGA durante el tratamiento con thiamet-G se muestran relevantes. Hemos demostrado que la acumulación de proteínas O-GlcNAc debida a la inhibición farmacológica de la actividad de OGA conduce a una inducción en su síntesis, y a una inhibición de OGT. Por esto, se podría especular que es la

actividad de ambas enzimas, más que la síntesis de proteínas, lo que debe estar regulado en tándem. Sin embargo, se requieren más estudios para profundizar en la regulación de la expresión de OGT y OGA, su síntesis y su actividad.

En resumen, este estudio demuestra que la diferenciación de condrocitos inducida por insulina está asociada con un incremento en las proteínas O-GlcNAc debido, al menos, en parte, a un aumento en la presencia de OGT. Además, la acumulación de proteínas O-GlcNAc inducida por la inhibición de OGA, en ausencia de insulina, indujo tanto la diferenciación condrocitaria mediante la activación de vías de señalización moleculares específicas, como el remodelado de la matriz a través de la presencia aumentada de diferentes MMPs.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Las proteínas que se modifican por O-GlcNAc en el cartílago artrósico son diferentes en comparación con las presentes en el cartílago sano. La clasificación de estas proteínas en función de los procesos biológicos en los que participan, revela también un perfil sustancialmente diferente en ambas situaciones. Así, las proteínas modificadas por O-GlcNAc en el cartílago sano son fundamentalmente las asociadas a los procesos de organización del citoesqueleto, adhesión celular, inhibición de la proliferación o inhibición de la neoangiogénesis. Por el contrario, en el cartílago artrósico, se pierden estas proteínas O-GlcNAc y, sin embargo, aparecen con esta modificación proteínas relacionadas con el desensamblaje de la matriz extracelular, la proteólisis, el remodelado tisular y los factores de la cascada de la coagulación. Estos datos sugieren que las proteínas O-GlcNAc podrían ser un marcador de la actividad celular en un determinado estado de la célula.
2. La O-GlcNAc de proteínas está involucrada en la condrogénesis, ya que un incremento en la cantidad de estas proteínas inducido por una inhibición específica de la glicanasa (OGA), afecta al desarrollo de la placa de crecimiento endocondral. Un aumento en la cantidad de proteínas O-GlcNAc incrementa la altura de la placa crecimiento por una acción específica sobre el número de condrocitos hipertróficos. Otros procesos celulares que se dan en la placa de crecimiento, similares a los que pueden darse en la artrosis, como son la proliferación celular o la calcificación de la matriz extracelular, parecen no alterarse con un incremento de O-GlcNAc.
3. Mediante estudios *in vitro*, hemos demostrado que la diferenciación hipertrófica del condrocito, inducida por insulina o por ácido ascórbico, está acompañada por un incremento previo en la O-GlcNAc neta celular. La O-GlcNAc no solo es necesaria sino que también es suficiente para la expresión de genes marcadores de hipertrofia condrocitaria, como Col II, Agg, Runx2, ALP, Col X, IHH y PTHR1. La inhibición específica de la OGA, que induce un acúmulo de proteínas O-GlcNAc, produce además la activación de mediadores implicados en el remodelado de la matriz, como MMP-2 y MMP-9 y la activación de segundos mensajeros moleculares característicos de la diferenciación hipertrófica condrocitaria, como JNK, ERK y p38.

4. La diferenciación hipertrófica de los condrocitos inducida por la inhibición de OGA fue similar a la que se indujo por la presencia de insulina, en cuanto al incremento de genes marcadores de diferenciación, o la activación de segundos mensajeros. Sin embargo, la síntesis de proteoglicanos inducida por ambos procesos fue sustancialmente diferente. Probablemente, esta diferencia sea debida a la actividad de la enzima AKT, regulada tanto por fosforilación como por O-GlcNAc durante la hipertrofia condrocitaria. El acúmulo de proteínas O-GlcNAc, inducido por la inhibición específica de OGA, no fue capaz de inducir la fosforilación de la enzima AKT, pero sí el incremento en su modificación por O-GlcNAc.

Nuestros resultados indican que la modificación de proteínas por O-GlcNAc, es un proceso asociado a la puesta en marcha de procesos de diferenciación hipertrófica del condrocito, un fenómeno característico de la degeneración del cartílago durante la artrosis humana. Estos datos podrían abrir otras perspectivas en el diseño de nuevas terapias para el tratamiento de esta enfermedad tan prevalente y para la que no disponemos de un arsenal terapéutico adecuado.

## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

- 1 Van Dijk GM, Veenhof C, Schellevis F, *et al.* Comorbidity, limitations in activities and pain in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *BMC musculoskeletal disorders* 2008;**9**:95.
- 2 Elliott a L, Kraus VB, Fang F, *et al.* Joint-specific hand symptoms and self-reported and performance-based functional status in African Americans and Caucasians: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;**66**:1622–6.
- 3 Jordan J, Luta G, Renner J, *et al.* Knee pain and knee osteoarthritis severity in self-reported task specific disability: the Johnston County Osteoarthritis Project. *The Journal of rheumatology* 1997;**24**:1344–9.
- 4 Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, *et al.* The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham study. *American Journal of public health* 1994;**84**:351–8.
- 5 Anderson AS, Loeser RF. Why is OA an age-related disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;**24**:1–18.
- 6 Verzijl N, Bank R a, TeKoppele JM, *et al.* AGEing and osteoarthritis: a different perspective. *Current opinion in rheumatology* 2003;**15**:616–22.
- 7 Kadam UT. Clinical comorbidity in patients with osteoarthritis: a case-control study of general practice consultants in England and Wales. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2004;**63**:408–14.
- 8 Hunter DJ, Zhang Y, Sokolove J, *et al.* Trapeziometacarpal subluxation predisposes to incident trapeziometacarpal osteoarthritis (OA): the Framingham Study. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2005;**13**:953–7.
- 9 Roman-Blas J a, Castañeda S, Largo R, *et al.* Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis research & therapy* 2009;**11**:241.
- 10 Valdes AM, Loughlin J, Timms KM, *et al.* Genome-wide Association Scan Identifies a Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Variant Involved in Risk of Knee Osteoarthritis. 2008;;1231–40.
- 11 Herrero-Beaumont G, Roman-Blas J a, Castañeda S, *et al.* Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2009;**39**:71–80.
- 12 Castañeda S, Roman-Blas J a, Largo R, *et al.* Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology (Oxford, England)* 2013;;1–3.
- 13 Zhuo Q, Yang W, Chen J, *et al.* Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology* 2012;**8**:729–37.



- 14 Berenbaum F. Diabetes-induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype. *Postgraduate medical journal* 2012;**88**:240–2.
- 15 Poole a R, Kojima T, Yasuda T, *et al.* Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001;:S26–33.
- 16 Eyre DR, Weis M a, Wu J-J. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *European cells & materials* 2006;**12**:57–63.
- 17 Wu J-J, Weis MA, Kim LS, *et al.* Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:18537–44.
- 18 Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, *et al.* Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *The Journal of clinical investigation* 1998;**102**:2115–25.
- 19 Huebner JL, Williams JM, Deberg M, *et al.* Collagen fibril disruption occurs early in primary guinea pig knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010;**18**:397–405.
- 20 Lotz M, Blanco FJ, von Kempis J, *et al.* Cytokine regulation of chondrocyte functions. *The Journal of rheumatology Supplement* 1995;**43**:104–8.
- 21 Aigner T, Soeder S, Haag J. IL-1 $\beta$  and BMPs - Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *European cells & materials* 2006;**12**:49–56.
- 22 Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, *et al.* Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis & Rheumatism* 2012;**64**:1697–707.
- 23 Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2009;**11**:224.
- 24 Bau B, Gebhard PM, Haag J, *et al.* Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis and rheumatism* 2002;**46**:2648–57.
- 25 Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, *et al.* Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *The Journal of biological chemistry* 2004;**279**:43514–21.
- 26 Aigner T, Fundel K, Saas J, *et al.* Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2006;**54**:3533–44.
- 27 Brandt KD, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *The Medical clinics of North America* 2009;**93**:1–24, xv.

- 28 Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. 2013;**1824**:133–45.
- 29 Knäuper V, López-Otin C, Smith B, *et al.* Biochemical characterization of human collagenase-3. *The Journal of biological chemistry* 1996;**271**:1544–50.
- 30 Mitchell PG, Magna H a, Reeves LM, *et al.* Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *The Journal of clinical investigation* 1996;**97**:761–8.
- 31 Reboul P, Pelletier J, Tardif G, *et al.* The new collagenase , collagenase-3 , is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. *The Journal of clinical investigation* 2011;:2011–9.
- 32 Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology* 2008;**4**:128–35.
- 33 Benton HP, Tyler J a. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin 1. *Biochemical and biophysical research communications* 1988;**154**:421–8.
- 34 Tyler J a, Benton HP. Synthesis of type II collagen is decreased in cartilage cultured with interleukin 1 while the rate of intracellular degradation remains unchanged. *Collagen and related research* 1988;**8**:393–405.
- 35 Masuko-Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, *et al.* Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis and rheumatism* 2004;**50**:2829–38.
- 36 Whiteman M, Spencer JPE, Zhu YZ, *et al.* Peroxynitrite-modified collagen-II induces p38/ERK and NF-kappaB-dependent synthesis of prostaglandin E2 and nitric oxide in chondrogenically differentiated mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2006;**14**:460–70.
- 37 Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, *et al.* Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 1999;**7**:377–9.
- 38 Hedbom E, Häuselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cellular and molecular life sciences* □: CMLS 2002;**59**:45–53.
- 39 Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ. Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone* 2009;**44**:522–7.
- 40 Blom AB, Brockbank SM, van Lent PL, *et al.* Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis and rheumatism* 2009;**60**:501–12.

- 41 Van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2012;**20**:223–32.
- 42 Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;**423**:332–6.
- 43 De Luca F. Impaired growth plate chondrogenesis in children with chronic illnesses. *Pediatric research* 2006;**59**:625–9.
- 44 Beier F. Cell-cycle control and the cartilage growth plate. *Journal of cellular physiology* 2005;**202**:1–8.
- 45 Hutchison MR, Bassett MH, White PC. Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone, affect growth plate chondrocyte proliferation. *Endocrinology* 2007;**148**:3122–30.
- 46 Phornphutkul C, Wu K-Y, Gruppuso P a. The role of insulin in chondrogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 2006;**249**:107–15.
- 47 Liu JP, Baker J, Perkins a S, *et al.* Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993;**75**:59–72.
- 48 Beam H a, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *Journal of orthopaedic research* 2002;**20**:1210–6.
- 49 Gandhi A, Beam H a, O'Connor JP, *et al.* The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2005;**37**:482–90.
- 50 Kayal R a, Alblowi J, McKenzie E, *et al.* Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone* 2009;**44**:357–63.
- 51 DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2000;**8**:309–34.
- 52 Linsenmayer TF, Toole BP, Trelstad RL. Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development. *Developmental biology*. 1973;**35**:232–9.
- 53 Bi W, Deng JM, Zhang Z, *et al.* Sox9 is required for cartilage formation. *Nature genetics* 1999;**22**:85–9.
- 54 Akiyama H, Chaboissier M-C, Martin JF, *et al.* The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and

- is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development* 2002;**16**:2813–28.
- 55 St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon a P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development* 1999;**13**:2072–86.
- 56 Van Donkelaar CC, Huiskes R. The PTHrP-Ihh feedback loop in the embryonic growth plate allows PTHrP to control hypertrophy and Ihh to regulate proliferation. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 2007;**6**:55–62.
- 57 Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, *et al.* BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 2001;**128**:4523–34.
- 58 Mak KK, Kronenberg HM, Chuang P-T, *et al.* Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* 2008;**135**:1947–56.
- 59 Bush PG, Parisinos C a, Hall AC. The osmotic sensitivity of rat growth plate chondrocytes in situ; clarifying the mechanisms of hypertrophy. *Journal of cellular physiology* 2008;**214**:621–9.
- 60 Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism* 2008;**58**:1377–88.
- 61 Shimizu E, Selvamurugan N, Westendorf JJ, *et al.* HDAC4 represses matrix metalloproteinase-13 transcription in osteoblastic cells, and parathyroid hormone controls this repression. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:9616–26.
- 62 Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, *et al.* Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes & development* 2001;**15**:467–81.
- 63 Stanton L-A, Sabari S, Sampaio A V, *et al.* p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *The Biochemical journal* 2004;**378**:53–62.
- 64 Arnold M a, Kim Y, Czubryt MP, *et al.* MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Developmental cell* 2007;**12**:377–89.
- 65 Yoshida C a, Yamamoto H, Fujita T, *et al.* Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & development* 2004;**18**:952–63.

- 66 Kwon T-G, Zhao X, Yang Q, *et al.* Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1 $\alpha$  induce vascular endothelial growth factor gene expression. *Journal of cellular biochemistry* 2011;**112**:3582–93.
- 67 Inada M, Wang Y, Byrne MH, *et al.* Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;**101**:17192–7.
- 68 Fosang a J, Last K, Knäuper V, *et al.* Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS letters* 1996;**380**:17–20.
- 69 Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthodontics & craniofacial research* 2005;**8**:11–7.
- 70 JP I, S N, Y N, *et al.* Growth plate matrix vesicle biogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1994;**306**:222–9.
- 71 Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports* 2003;**5**:222–6.
- 72 Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, *et al.* The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta biochimica Polonica* 2003;**50**:1019–38.
- 73 T K. Annexins and tissue mineralization: Matrix vesicles, ion channel activity of annexins and annexin V/collagen interactions. *Annexins* 2003;:172–81.
- 74 Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology* 2004;**14**:86–93.
- 75 Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells, tissues, organs* 2009;**189**:88–92.
- 76 Shapiro IM, Adams CS, Freeman T, *et al.* Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth defects research Part C, Embryo today* □: reviews 2005;**75**:330–9.
- 77 McGlashan SR, Haycraft CJ, Jensen CG, *et al.* Articular cartilage and growth plate defects are associated with chondrocyte cytoskeletal abnormalities in Tg737orpk mice lacking the primary cilia protein polaris. *Matrix biology* □: *journal of the International Society for Matrix Biology* 2007;**26**:234–46.
- 78 Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth defects research Part C, Embryo today* 2003;**69**:14–55.

- 
- 79 Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, *et al.* Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis research & therapy* 2005;**7**:R560–8.
- 80 Pfander D, Swoboda B, Kirsch T. Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *The American journal of pathology* 2001;**159**:1777–83.
- 81 Von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, *et al.* Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis & Rheumatism* 1992;**35**:806–11.
- 82 Poole a R, Nelson F, Dahlberg L, *et al.* Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochemical Society symposium* 2003;:115–23.
- 83 Kühn K. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004;**12**:1–16.
- 84 Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, *et al.* Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2009;**60**:2694–703.
- 85 Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell* 2005;**8**:739–50.
- 86 Guo X, Mak KK, Taketo MM, *et al.* The Wnt/beta-catenin pathway interacts differentially with PTHrP signaling to control chondrocyte hypertrophy and final maturation. *PloS one* 2009;**4**:e6067.
- 87 Zhu M, Chen M, Zuscik M, *et al.* Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis and rheumatism* 2008;**58**:2053–64.
- 88 Zhu M, Tang D, Wu Q, *et al.* Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009;**24**:12–21.
- 89 Van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: To serve and protect or a wolf in sheep clothing's? *Osteoarthritis and Cartilage* 2010;**18**:735–41.
- 90 Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, *et al.* Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nature medicine* 2009;**15**:1421–5.
- 91 Little C, Barai A, Burkhardt D, *et al.* Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis & Rheumatism* 2009;**60**:3723–33.

- 
- 92 Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, *et al.* Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis and rheumatism* 2006;**54**:2462–70.
- 93 Mobasheri A, Neama G, Bell S, *et al.* Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9. *Cell biology international* 2002;**26**:297–300.
- 94 Mobasheri A, Vannucci SJ, Bondy C a, *et al.* Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histology and histopathology* 2002;**17**:1239–67.
- 95 Vannucci SJ, Rutherford T, Wilkie MB, *et al.* Prenatal expression of the GLUT4 glucose transporter in the mouse. *Developmental neuroscience*. 2000;**22**:274–82.
- 96 Rosa SC, Gonçalves J, Judas F, *et al.* Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. *Arthritis research & therapy* 2009;**11**:R80.
- 97 Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;**3**:97–130.
- 98 Rademacher T, Parekh R, Dwek R. Glycobiology. *Glycobiology* 1988;**57**:785–838.
- 99 Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *European journal of biochemistry / FEBS* 1993;**218**:1–27.
- 100 Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annual review of biochemistry*. 2003;**72**:643–91.
- 101 Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, *et al.* Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual review of biochemistry*. 2008;**77**:521–55.
- 102 Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1992;**209**:483–501.
- 103 Hurtado-Guerrero R, Davies GJ. Recent structural and mechanistic insights into post-translational enzymatic glycosylation. *Current opinion in chemical biology* 2012;**16**:479–87.
- 104 Wacker M, Linton D, Hitchen PG, *et al.* N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science (New York, N.Y.)*. 2002;**298**:1790–3.
- 105 Yamashita K, Ideo H, Ohkura T, *et al.* Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. *The journal of biological chemistry* 1993;**268**:5783–9.

- 
- 106 Wei X, Decker JM, Wang S, *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;**422**:307–12.
- 107 Reitter JN, Means RE, Desrosiers RC. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nature medicine*. 1998;**4**:679–84.
- 108 Landberg E, Pålsson P, Lundblad a, *et al.* Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;**210**:267–74.
- 109 Jaeken J, Carchon H. Congenital disorders of glycosylation: the rapidly growing tip of the iceberg. *Current opinion in neurology*. 2001;**14**:811–5.
- 110 Wang X, Inoue S, Gu J, *et al.* Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;**102**:15791–6.
- 111 Chou C-T. Binding of rheumatoid and lupus synovial fluids and sera-derived human IgG rheumatoid factor to degalactosylated IgG. *Archives of medical research* 2002;**33**:541–4.
- 112 Parekh RB, Dwek R a, Sutton BJ, *et al.* Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 1985;**316**:452–7.
- 113 Watson M, Rudd PM, Bland M, *et al.* Sugar printing rheumatic diseases: a potential method for disease differentiation using immunoglobulin G oligosaccharides. *Arthritis and rheumatism*. 1999;**42**:1682–90.
- 114 Matsushashi T, Iwasaki N, Nakagawa H, *et al.* Alteration of N-glycans related to articular cartilage deterioration after anterior cruciate ligament transection in rabbits. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2008;**16**:772–8.
- 115 Urita A, Matsushashi T, Onodera T, *et al.* Alterations of high-mannose type N-glycosylation in human and mouse osteoarthritis cartilage. *Arthritis and rheumatism* 2011;**63**:3428–38.
- 116 Carlson C, Loeser R, Purser C, *et al.* Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on theseverity of disease. *Journal of bone and mineral research* 1996;**11**:1209–17.
- 117 Park L, Raman KG, Lee KJ, *et al.* Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature medicine* 1998;**4**:1025–31.
- 118 Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, *et al.* Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: potential role in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2006;**52**:2376–85.



- 119 DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJG, *et al.* Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2004;**50**:1207–15.
- 120 Neeper M, Schmidt a M, Brett J, *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry* 1992;**267**:14998–5004.
- 121 Rosenbloom a L, Silverstein JH. Connective tissue and joint disease in diabetes mellitus. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 1996;**25**:473–83.
- 122 Brett J, Schmidt a M, Yan SD, *et al.* Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *The American journal of pathology* 1993;**143**:1699–712.
- 123 Huang C-Y, Hung L-F, Liang C-CT, *et al.* COX-2 and iNOS are critical in advanced glycation end product-activated chondrocytes in vitro. *European journal of clinical investigation* 2009;**39**:417–28.
- 124 Rosa SC, Rufino AT, Judas FM, *et al.* Role of glucose as a modulator of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *Journal of cellular biochemistry* 2011;**112**:2813–24.
- 125 Hanover J a, Krause MW, Love DC. The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochimica et biophysica acta* 2010;**1800**:80–95.
- 126 Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007;**446**:1017–22.
- 127 Love DC, Hanover J a. The hexosamine signaling pathway: deciphering the “O-GlcNAc code”. *Science’s STKE* 2005;**312**:re13. □: signal transduction
- 128 Vosseller K, Sakabe K, Wells L, *et al.* Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification. *Current Opinion in Chemical Biology* 2002;**6**:851–7.
- 129 Zachara NE, Hart GW. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et biophysica acta* 2004;**1673**:13–28.
- 130 Zachara NE, Hart GW. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochimica et biophysica acta* 2006;**1761**:599–617.
- 131 Wells L, Gao Y, Mahoney JA, *et al.* Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. 2002;**277**:1755–61.

- 132 Zeidan Q, Wang Z, Maio A De, *et al.* O-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify core ribosomal proteins. *Molecular biology of the cell* 2010;**21**:1922–36.
- 133 Hanover J a, Yu S, Lubas WB, *et al.* Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of biochemistry and biophysics* 2003;**409**:287–97.
- 134 Matsuura A, Ito M, Sakaidani Y, *et al.* O-linked N-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors. *The Journal of biological chemistry* 2008;**283**:35486–95.
- 135 Slawson C, Copeland RJ, Hart GW. O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? *Trends in biochemical sciences* 2010;**35**:547–55.
- 136 Wells L, Vosseller K, Hart GW. A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. 2003;**60**:222–8.
- 137 Torres CR, Hart GW. Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes. 1984;**3**:308–17.
- 138 Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2006;**290**:1–15.
- 139 Wells L. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc. *Science* 2001;**291**:2376–8.
- 140 Hanover JA. Glycan-dependent signaling linked to N-acetylglucosamine. *FASEB journal* 2001;**15**:1865–76. □: official publication
- 141 Slawson C, Housley MP, Hart GW. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *Journal of cellular biochemistry* 2006;**97**:71–83.
- 142 Wells L, Whelan S a, Hart GW. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;**302**:435–41.
- 143 Mishra S, Ande SR, Salter NW. O-GlcNAc modification associated with phosphorylation □: why so intimate? *Cell Communication and Signaling* 2011;**9**:1.
- 144 Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, *et al.* Cross Talk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease. *Annu Rev Biochem* 2011;**80**:825–58.
- 145 Wang Z, Gucuk M, Hart GW. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally

- elevated O-GlcNAc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;**105**:13793–8.
- 146 Wang Z, Pandey A, Hart GW. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Molecular & cellular proteomics* 2007;**6**:365–79.
- 147 Wang Z, Udeshi ND, Slawson C, *et al.* Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Science signaling* 2010;**3**:1–22.
- 148 Kamemura K, Hart GW. Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 2003;**73**:107–36.
- 149 Chou TY, Hart GW, Dang C V. c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *The Journal of biological chemistry*. 1995;**270**:18961–5.
- 150 Cheng X, Cole RN, Zaia J, *et al.* Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* 2000;**39**:11609–20.
- 151 Kelly WG, Dahmuss ME, Hartll GW. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *The Journal of biological chemistry* 1993;**268**:10416–24.
- 152 Comer FI, Hart GW. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 2001;**40**:7845–52.
- 153 Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, *et al.* Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. 2001;**108**:1341–8.
- 154 Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, *et al.* A Mitotic GlcNAcylation / Phosphorylation Signaling Complex Alters the Posttranslational State of the Cytoskeletal Protein Vimentin. 2008;**19**:4130–40.
- 155 Yang WH, Kim JE, Nam HW, *et al.* Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nature cell biology* 2006;**8**:1074–83.
- 156 Dias WB, Cheung WD, Wang Z, *et al.* Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. *The Journal of biological chemistry* 2009;**284**:21327–37.
- 157 Sayat R, Leber B, Grubac V, *et al.* O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Experimental cell research* 2008;**314**:2774–87.

- 
- 158 Wang S, Huang X, Sun D, *et al.* Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling. *PLoS one* 2012;**7**:e37427.
- 159 Ball LE, Berkaw MN, Buse MG. Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Molecular & cellular proteomics* 2004;**3**:13–23.
- 160 Ramirez-Correa G a, Jin W, Wang Z, *et al.* O-linked GlcNAc modification of cardiac myofilament proteins: a novel regulator of myocardial contractile function. *Circulation research* 2008;**103**:1354–8.
- 161 Wells L, Kreppel LK, Comer FI, *et al.* O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *The Journal of biological chemistry* 2004;**279**:38466–70.
- 162 Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN. Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett* 2008;**580**:3051–8.
- 163 Kang E-S, Han D, Park J, *et al.* O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Experimental cell research* 2008;**314**:2238–48.
- 164 Luo B, Soesanto Y, McClain D a. Protein modification by O-linked GlcNAc reduces angiogenesis by inhibiting Akt activity in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008;**28**:651–7.
- 165 Robles-Flores M, Meléndez L, García W, *et al.* Posttranslational modifications on protein kinase c isozymes. Effects of epinephrine and phorbol esters. *Biochimica et biophysica acta* 2008;**1783**:695–712.
- 166 Matthews J a, Acevedo-Duncan M, Potter RL. Selective decrease of membrane-associated PKC-alpha and PKC-epsilon in response to elevated intracellular O-GlcNAc levels in transformed human glial cells. *Biochimica et biophysica acta* 2005;**1743**:305–15.
- 167 Whelan S a, Lane MD, Hart GW. Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *The Journal of biological chemistry* 2008;**283**:21411–7.
- 168 Beausoleil S a, Jedrychowski M, Schwartz D, *et al.* Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;**101**:12130–5.
- 169 Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, *et al.* Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 2004;**279**:30133–42.
- 170 Xing D, Feng W, Nöt LG, *et al.* Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial

- injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2008;**295**:H335–42.
- 171 Yang S, Zou L-Y, Bounelis P, *et al.* Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. *Shock* 2006;**25**:600–7.
  - 172 Chatham JC, Marchase RB. The role of protein O-linked beta-N-acetylglucosamine in mediating cardiac stress responses. *Biochimica et biophysica acta* 2010;**1800**:57–66.
  - 173 Fülöp N, Zhang Z, Marchase RB, *et al.* Glucosamine cardioprotection in perfused rat heart associated with increased O-Linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2010;**292**:H2227–H2236.
  - 174 Fülöp N, Marchase RB, Chatham JC. Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovascular research* 2007;**73**:288–97.
  - 175 Fülöp N, Mason MM, Dutta K, *et al.* Impact of Type 2 diabetes and aging on cardiomyocyte function and O-linked N-acetylglucosamine levels in the heart. *American journal of physiology Cell physiology* 2007;**292**:C1370–8.
  - 176 McClain D a, Crook ED. Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes*. 1996;**45**:1003–9.
  - 177 McClain D a. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 2002;**16**:72–80.
  - 178 Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, *et al.* Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 2008;**451**:964–9.
  - 179 Klein AL, Berkaw MN, Buse MG, *et al.* O-linked N-acetylglucosamine modification of insulin receptor substrate-1 occurs in close proximity to multiple SH2 domain binding motifs. *Molecular & cellular proteomics* □: MCP 2009;**8**:2733–45.
  - 180 Özcan S, Andrali SS, Cantrell JEL. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochimica et biophysica acta* 2010;**1799**:353–64.
  - 181 McClain D a, Paterson a J, Roos MD, *et al.* Glucose and glucosamine regulate growth factor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;**89**:8150–4.
  - 182 Kudlow JE. Post-translational modification by O-GlcNAc: another way to change protein function. *Journal of cellular biochemistry* 2006;**98**:1062–75.

- 183 Goldberg HJ, Scholey J, Fantus IG, *et al.* Glucosamine activates the plasminogen activator binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes* 2000;**49**:863–71.
- 184 Solomon SS, Majumdar G, Martinez-Hernandez A, *et al.* A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. *Life sciences* 2008;**83**:305–12.
- 185 Dias WB, Hart GW. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Molecular bioSystems* 2007;**3**:766–72.
- 186 Mazars R, Gonzalez-de-Peredo A, Cayrol C, *et al.* The THAP-zinc finger protein THAP1 associates with coactivator HCF-1 and O-GlcNAc transferase: a link between DYT6 and DYT3 dystonias. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:13364–71.
- 187 Kroner Z. The Relationship between Alzheimer ' s Disease and Diabetes 3 Diabetes *Alternative Medicine Review* 2009;**14**:373–9. □: Type
- 188 Pilcher H. Alzheimer's disease could be type 3 diabetes. *Lancet neurology* 2006;**5**:388–9.
- 189 Liu F, Shi J, Tanimukai H, *et al.* Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology* 2009;**132**:1820–32.
- 190 Alexander GE, Ph D, Chen K, *et al.* Longitudinal PET Evaluation of Cerebral Metabolic Decline in Dementia: A Potential Outcome Measure in Alzheimer ' s Disease Treatment Studies. *The american journal of psychiatry* 2002;**159**:738–45.
- 191 Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, *et al.* Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 2010;**1800**:67–79.
- 192 Liu F, Iqbal K, Grundke-iqbal I, *et al.* O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer ' s disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;**101**:10804–9.
- 193 Lüdemann N, Clement A, Hans VH, *et al.* O-glycosylation of the tail domain of neurofilament protein M in human neurons and in spinal cord tissue of a rat model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *The Journal of biological chemistry* 2005;**280**:31648–58.
- 194 Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, *et al.* Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *The Journal of biological chemistry* 2009;**284**:547–55.

- 
- 195 Chou TY, Dang C V., Hart GW. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;**92**:4417–21.
- 196 Wells L, Slawson C, Hart GW. The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids* 2011;**40**:877–83.
- 197 Lefebvre T, Pinte S, Guérardel C, *et al.* The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *European journal of biochemistry / FEBS* 2004;**271**:3843–54.
- 198 Cheng X, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *The Journal of biological chemistry* 2001;**276**:10570–5.
- 199 Wu W, Pasternack L, Huang D, *et al.* Structural Study on O -Glycopeptides □: Glycosylation-Induced Conformational Changes of O -GlcNAc , O -LacNAc , O -Sialyl-LacNAc , and O -Sialyl-Lewis-X Peptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1. *Journal of the american chemical society* 1999;**121**:2409–17.
- 200 Liang F-C, Chen RP-Y, Lin C-C, *et al.* Tuning the conformation properties of a peptide by glycosylation and phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;**342**:482–8.
- 201 Zhu W, Leber B, Andrews DW. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *The EMBO journal* 2001;**20**:5999–6007.
- 202 Caldwell S a, Jackson SR, Shahriari KS, *et al.* Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*. 2010;**29**:2831–42.
- 203 Shi Y, Tomic J, Wen F, *et al.* Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2010;**24**:1588–98.
- 204 Macauley MS, Vocadlo DJ. Increasing O-GlcNAc levels: An overview of small-molecule inhibitors of O-GlcNAcase. *Biochimica et biophysica acta* 2010;**1800**:107–21.
- 205 Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, *et al.* A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nature chemical biology* 2008;**4**:483–90.
- 206 Macauley MS, Shan X, Yuzwa SA, *et al.* Elevation of Global O-GlcNAc in rodents using a selective O-GlcNAcase inhibitor does not cause insulin resistance or perturb glucohomeostasis. *Chemistry & biology* 2010;**17**:949–58.
- 207 Bailón-Plaza a, Lee a O, Veson EC, *et al.* BMP-5 deficiency alters chondrocytic activity in the mouse proximal tibial growth plate. *Bone* 1999;**24**:211–6.

- 208 Mikic B, Clark RT, Battaglia TC, *et al.* Altered hypertrophic chondrocyte kinetics in GDF-5 deficient murine tibial growth plates. *Journal of orthopaedic research* 2004;**22**:552–6.
- 209 Leon IR, Schwämmle V, Jensen ON, *et al.* Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Molecular & cellular proteomics* 2013;**12**:P46.
- 210 Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research*. 2012;**40**:W478–83.
- 211 Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, *et al.* GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology*. 2007;**8**:R3.
- 212 Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, *et al.* GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic acids research*. 2009;**37**:W317–22.
- 213 Alvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G, Moreno-Rubio J, *et al.* Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2008;**16**:1484–93.
- 214 Tardio L\*, Andrés-Bergós J\*, Zachara NE, *et al.* O-linked N-Acetyl-glucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013;:\* Both authors contributed equally (Submitted).
- 215 Balbona K, Tran H, Godyna S, *et al.* Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *The Journal of biological chemistry* 1992;**267**:20120–5.
- 216 Pan TC, Kluge M, Zhang RZ, *et al.* Sequence of extracellular mouse protein BM-90/fibulin and its calcium-dependent binding to other basement-membrane ligands. *European journal of biochemistry / FEBS* 1993;**215**:733–40.
- 217 Tran H, Tanaka a, Litvinovich S V, *et al.* The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *The Journal of biological chemistry*. 1995;**270**:19458–64.
- 218 Macauley MS, Bubb AK, Martinez-Fleites C, *et al.* Elevation of global O-GlcNAc levels in 3T3-L1 adipocytes by selective inhibition of O-GlcNAcase does not induce insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* 2008;**283**:34687–95.



- 219 Fukai A, Kawamura N, Saito T, *et al.* Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis and rheumatism* 2010;**62**:826–36.
- 220 Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, *et al.* A novel role for GADD45beta as a mediator of MMP-13 gene expression during chondrocyte terminal differentiation. *The Journal of biological chemistry* 2005;**280**:38544–55.
- 221 Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, *et al.* A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. Cell differentiation and development Biologists. 1990;**30**:109–16. □: the official jo
- 222 Temu TM, Wu K, Gruppuso PA, *et al.* The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2010;**299**:E325–34.
- 223 Brochhausen C, Lehmann M, Halstenberg S, *et al.* Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage – what can we learn from the growth plate? *J Tissue Eng Regen Med* 2009;**3**:416–29.
- 224 Vu TH, Shipley JM, Bergers G, *et al.* MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998;**93**:411–22.
- 225 Challa TD, Rais Y, Ornan EM. Effect of adiponectin on ATDC5 proliferation, differentiation and signaling pathways. *Molecular and cellular endocrinology* 2010;**323**:282–91.
- 226 Bobick BE, Kulyk WM. Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth defects research Part C, Embryo today* 2008;**84**:431–54.
- 227 Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *The Journal of biological chemistry* 2001;**276**:14466–73.
- 228 Ulici V, Hoenselaar KD, Gillespie JR, *et al.* The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation. *BMC developmental biology* 2008;**8**:40.
- 229 Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H, *et al.* Phosphorylation of GSK-3β by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes. 2008;**118**. doi:10.1172/JCI35243.2506
- 230 Vosseller K, Wells L, Hart GW. Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics. *Biochimie* 2001;**83**:575–81.

- 231 Chalkley RJ, Thalhammer A, Schoepfer R, *et al.* Identification of protein O-GlcNAcylation sites using electron transfer dissociation mass spectrometry on native peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;**106**:8894–9.
- 232 Vosseller K, Trinidad JC, Chalkley RJ, *et al.* O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics* □: MCP. 2006;**5**:923–34.
- 233 Myers S a, Panning B, Burlingame AL. Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific O-GlcNAc distribution in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;**108**:9490–5.
- 234 Alfaro JF, Gong C, Monroe ME, *et al.* Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O -GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;**109**:7280–5.
- 235 Haudenschild DR, Chen J, Pang N, *et al.* Rho Kinase – Dependent Activation of SOX9 in Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 2010;**62**:191–200.
- 236 Haudenschild DR, Chen J, Steklov N, *et al.* Characterization of the chondrocyte actin cytoskeleton in living three-dimensional culture: response to anabolic and catabolic stimuli. *Mol Cell Biochem* 2010;**6**:135–44.
- 237 Haudenschild DR, Nguyen B, Chen J, *et al.* Rho kinase-dependent CCL20 induced by dynamic compression of human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 2009;**58**:2735–42.
- 238 Kim MJ, Kim S, Kim Y, *et al.* Inhibition of RhoA but not ROCK induces chondrogenesis of chick limb mesenchymal cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2012;**418**:500–5.
- 239 Liang J, Feng J, Wu WKK, *et al.* Leptin-mediated cytoskeletal remodeling in chondrocytes occurs via the RhoA/ROCK pathway. *Journal of orthopaedic research* □: *Orthopaedic Publications Society* 2011;**29**:369–74.
- 240 Woods A, Beier F. RhoA/ROCK signaling regulates chondrogenesis in a context-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 2006;**281**:13134–40.
- 241 Wang G, Woods A, Sabari S, *et al.* RhoA/ROCK signaling suppresses hypertrophic chondrocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* 2004;**279**:13205–14.
- 242 Woods A, Wang G, Beier F. Regulation of Chondrocyte Differentiation by the Actin Cytoskeleton and Adhesive Interactions. *Journal of Cellular Physiology* 2007;**1**:1–8.

- 
- 243 Loeser RF, Olex AL, McNulty M a, *et al.* Disease progression and phasic changes in gene expression in a mouse model of osteoarthritis. *PloS one*. 2013;**8**:e54633.
- 244 Champattanachai V, Netsirisawan P, Chaiyawat P, *et al.* Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics*. 2013;**13**:2088–99.
- 245 Arnold CS, Johnson G V, Cole RN, *et al.* The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of biological chemistry*. 1996;**271**:28741–4.
- 246 Ding M, Vandr  DD. High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine. *The Journal of biological chemistry*. 1996;**271**:12555–61.
- 247 Robertson L, Moya K, Breen K. The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer’s disease* 2004;**6**:489–95.
- 248 Ji S, Kang JG, Park SY, *et al.* O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino acids*. 2011;**40**:809–18.
- 249 Srikanth B, Vaidya MM, Kalraiya RD. O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. *The Journal of biological chemistry*. 2010;**285**:34062–71.
- 250 Hagmann J, Grob M, Burger MM. The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *The Journal of biological chemistry*. 1992;**267**:14424–8.
- 251 Holt G, Haltiwanger R, Torres C, *et al.* Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *The Journal of biological chemistry* 1987;**262**:14847–50.
- 252 Dong D, Xu Z, Chevrier M, *et al.* Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *The Journal of biological chemistry* 1993;**268**:16679–87.
- 253 Chou CF, Omary MB. Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *The Journal of biological chemistry*. 1993;**268**:4465–72.
- 254 Webster DM, Teo CF, Sun Y, *et al.* O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC developmental biology* 2009;**9**:28.
- 255 Ruiz-Romero C, López-Armada MJ, Blanco FJ. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics*. 2005;**5**:3048–59.

- 
- 256 Aigner T, Söder S, Gebhard PM, *et al.* Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence. *Nature clinical practice Rheumatology* 2007;**3**:391–9.
- 257 Katsumoto T, Mitsushima a, Kurimura T. The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization.* 1990;**68**:139–46.
- 258 Goldman RD, Khuon S, Chou YH, *et al.* The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *The Journal of cell biology.* 1996;**134**:971–83.
- 259 Ishihara K, Takahashi I, Tsuchiya Y, *et al.* Characteristic increase in nucleocytoplasmic protein glycosylation by O-GlcNAc in 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* 2010;**398**:489–94.
- 260 Bobick BE, Tuan RS, Chen FH. The intermediate filament vimentin regulates chondrogenesis of adult human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Journal of cellular biochemistry.* 2010;**109**:265–76.
- 261 Haudenschild DR, Chen J, Pang N, *et al.* Vimentin contributes to changes in chondrocyte stiffness in osteoarthritis. *Journal of orthopaedic research* □: official publication of the Orthopaedic Research Society 2011;**29**:20–5.
- 262 Capín-Gutiérrez N, Talamás-Rohana P, González-Robles a, *et al.* Cytoskeleton disruption in chondrocytes from a rat osteoarthrosic (OA) -induced model: its potential role in OA pathogenesis. *Histology and histopathology.* 2004;**19**:1125–32.
- 263 Lambrecht S, Verbruggen G, Verdonk PCM, *et al.* Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2008;**16**:163–73.
- 264 Rollín R, Marco F, Camafeita E, *et al.* Differential proteome of bone marrow mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2008;**16**:929–35.
- 265 Steward AJ, Wagner DR, Kelly DJ. The pericellular environment regulates cytoskeletal development and the differentiation of mesenchymal stem cells and determines their response to hydrostatic pressure. *European cells & materials.* 2013;**25**:167–78.
- 266 Burridge K, Fath K. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *BioEssays* □: news and molecular, cellular and developmental biology. 1989;**10**:104–8.

- 
- 267 Pesesse L, Sanchez C, Delcour J-P, *et al.* Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: Potential effect on angiogenesis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society.* 2013. doi:10.1016/j.joca.2013.08.018
- 268 Bektas M, Rubenstein DS. The role of intracellular protein O-glycosylation in cell adhesion and disease. *Journal of biomedical research* 2011;**25**:227–36.
- 269 Sakaidani Y, Nomura T, Matsuura A, *et al.* O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nature communications.* 2011;**2**:583.
- 270 Sakaidani Y, Ichiyanagi N, Saito C, *et al.* O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012;**419**:14–9.
- 271 Ko Y, Kobbe B, Nicolae C, *et al.* Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development. *Molecular and cellular biology.* 2004;**24**:1691–9.
- 272 Pan C-J, Ding H-Y, Dong Y-X. Extracellular matrix protein patterns guide human chondrocytes adhesion and alignment characterized by vimentin and matrilin-3. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2013;**102**:730–6.
- 273 Otten C, Wagener R, Paulsson M, *et al.* Matrilin-3 mutations that cause chondrodysplasias interfere with protein trafficking while a mutation associated with hand osteoarthritis does not. *Journal of medical genetics.* 2005;**42**:774–9.
- 274 Klatt AR, Klinger G, Paul-Klausch B, *et al.* Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes. *FEBS letters.* 2009;**583**:3611–7.
- 275 Hoffmann BR, Liu Y, Mosher DF. Modification of EGF-like module 1 of thrombospondin-1, an animal extracellular protein, by O-linked N-acetylglucosamine. *PloS one* 2012;**7**:e32762.
- 276 Van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. Loss of chondrocyte differentiation block during ageing. *Ageing research reviews* 2008;**7**:106–13.
- 277 Wang J, Torii M, Liu H, *et al.* dbOGAP - an integrated bioinformatics resource for protein O-GlcNAcylation. *BMC bioinformatics* 2011;**12**:91.
- 278 Chatham JC, Nöt LG, Fülöp N, *et al.* Hexosamine biosynthesis and protein O-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. *Shock (Augusta, Ga.).* 2008;**29**:431–40.
- 279 Hatsell S, Medina L, Merola J, *et al.* Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *The Journal of biological chemistry* 2003;**278**:37745–52.

- 280 Hu Y, Belke D, Suarez J, *et al.* Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. *Circulation research* 2005;**96**:1006–13.
- 281 Wang J, Zhou J, Bondy C a. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB journal* □: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 1999;**13**:1985–90.
- 282 Pritchard BJJ. A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J Anat* 1952;**86**:259–277.
- 283 Patti ME, Virkamäki a, Landaker EJ, *et al.* Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* 1999;**48**:1562–71.
- 284 Vosseller K, Wells L, Lane MD, *et al.* Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;**99**:5313–8.
- 285 Whelan S a, Dias WB, Thiruneelakantapillai L, *et al.* Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:5204–11.
- 286 Park S, Park S-H, Baek JY, *et al.* Protein O-GlcNAcylation regulates Drosophila growth through the insulin signaling pathway. *Cellular and molecular life sciences* 2011;**368**:377–84.
- 287 Krześlak A, Józwiak P, Lipińska A. Down-regulation of  $\beta$ -N-acetyl-D-glucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells. *Oncology reports* 2011;**26**:743–9.
- 288 Hsieh T-J, Lin T, Hsieh P-C, *et al.* Suppression of Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-1 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of cellular physiology* 2012;**227**:108–15.
- 289 Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis research & therapy* 2010;**12**:216.
- 290 Tchetina E V. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis* 2011;**2011**:683970.
- 291 Goldberg H, Whiteside C, Fantus IG. O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2011;**301**:E713–26.

- 
- 292 Tallent MK, Varghis N, Skorobogatko Y, *et al.* In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 2009;**284**:174–81.
- 293 Starkman BG, Cravero JD, Delcarlo M, *et al.* IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *The Biochemical journal* 2005;**389**:723–9.
- 294 Taylor RP, Parker GJ, Hazel MW, *et al.* Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 2008;**283**:6050–7.
- 295 Lunde IG, Aronsen JM, Kvaløy H, *et al.* Cardiac O-GlcNAc signaling is increased in hypertrophy and heart failure. *Physiological genomics*. 2012;**44**:162–72.
- 296 Belke DD. Swim-exercised mice show a decreased level of protein O-GlcNAcylation and expression of O-GlcNAc transferase in heart. *Journal of applied physiology* 2011;**111**:157–62.
- 297 Kazemi Z, Chang H, Haserodt S, *et al.* O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3 $\beta$ -dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:39096–107.

## **8. ANEXO**



**Trabajos que incluyen parcialmente resultados de esta tesis:**

- **Andrés-Bergós J**, Tardio L, Larranaga-Vera A, Gómez R, Herrero-Beaumont G, Largo R. "The increase in O-linked N-acetylglucosamine protein modification stimulates chondrogenic differentiation both in vitro and in vivo". J Biol Chem. 2012 Sep 28;287(40):33615-28.

- **Andrés-Bergós J**, Hernández ML, Larranaga-Vera A, Pérez-Baos S, Herrero-Beaumont G, Largo R. "O-Linked N-Acetylglucosamine Modified Proteome of Human Osteoarthritic Cartilage: Biological Significance". 2013 (In preparation).

**Trabajos desarrollados en el transcurso de esta tesis:**

- Tardio L\*, **Andrés-Bergós J\***, Zachara N E, Rodriguez-Villar C, Herrero-Beaumont G, Largo R. "O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification is increased in the cartilage of patients with knee osteoarthritis". Osteoarthritis cartilage. 2013 (Submitted).

\*Ambos autores contribuyeron equitativamente.

- **Andrés-Bergós J**, Pérez-Baos S, Larranaga-Vera A, Herrero-Beaumont G, Largo R. "RhoA pathway is modulated by O-Linked N-Acetylglucosamine protein modification during chondrocyte hypertrophy". 2013 (In preparation).

- **Andrés-Bergós J**, Otero M, Larranaga-Vera A, Pérez-Baos S, Goldring M B, Herrero-Beaumont G, Largo R. "Regulation of MMP13 promoter by O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification in osteoarthritis". (In preparation) 2013 (Submitted).

## Comunicaciones a congresos internacionales:

- R. Largo, A. Larranaga-Vera, S. Pérez-Baos, G. Herrero-Beaumont, **J. Andrés-Bergós**. “Role of Procatabolic Cytokines in the Dysregulation of O-Linked N-Acetylglucosamine Modified Proteins in Human Osteoarthritic Chondrocytes”. *Annual Meeting, American College of Rheumatology (ACR). San Diego (CA), Oct 2013.*
  
- **J. Andrés-Bergós**, M. L. Hernáez, M. Otero, A. Larranaga-Vera, S. Pérez-Baos, M. B. Goldring, G. Herrero-Beaumont, R. Largo. “O-Linked N-Acetylglucosamine Modified Proteome of Human Osteoarthritic Cartilage: Biological Significance”. *Annual Meeting, American College of Rheumatology (ACR). San Diego (CA), Oct 2013.*
  
- **J. Andrés-Bergós**, L. Tardío, A. Villalvilla, R. Gómez, G. Herrero-Beaumont and R. Largo. “O-GlcNAc protein modification stimulates chondrogenesis in vitro and chondrocyte hypertrophy in mouse”. *ECTS, European Calcified Tissue Society. Stockholm, May 2012.*
  
- L. Tardío, **J. Andrés-Bergós**, G. Herrero-Beaumont and R. Largo. “Study of the O-linked-N-acetyl-glucosaminylation of proteins induced by high doses of glucosamine and its correlation with osteoarthritis progression”. *ECTS, European Calcified Tissue Society. Stockholm, May 2012.*
  
- **J. Andrés-Bergós**, L. Tardío, A. Villalvilla, R. Gómez, G. Herrero-Beaumont and R. Largo. “O-GlcNAc protein modification stimulates chondrogenesis in vitro and chondrocyte hypertrophy in mouse”. *OARSI, World Congress on Osteoarthritis. Barcelona, April 2012.*
  
- G. Herrero-Beaumont, L. Tardío, **J. Andrés-Bergós**, and R. Largo. “Identification of an extracellular O-N-Acetyl-Glycosylase responsible for an increased level of O-linked N-Acetylglucosamine modified proteins in the cartilage of patients with osteoarthritis”. *OARSI, World Congress on Osteoarthritis. Barcelona, April 2012.*

- R. Largo, L. Tardío, **J. Andrés-Bergós**, and G. Herrero-Beaumont. “Study of the O-linked-N-acetyl-glucosaminylation of proteins induced by high doses of glucosamine and its correlation with osteoarthritis progression”. *OARSI, World Congress on Osteoarthritis*. Barcelona, April 2012.
  
- **J. Andrés-Bergós**, L. Tardío, A. Villalvilla, R. Gómez, G. Herrero-Beaumont and R. Largo. “O-GlcNAc protein modification stimulates chondrogenesis in vitro and chondrocyte hypertrophy in mouse”. *EWRR, European Workshop of Rheumatology Research*. Stockholm, February 2012.
  
- L. Tardío, **J. Andrés**, G. Herrero-Beaumont and R. Largo. “Protein O-Linked N-Acetylglucosamine levels in the cartilage of patients with knee osteoarthritis”. *EWRR, European Workshop of Rheumatology Research*. Amsterdam, March 2011.
  
- L. Tardío, G. Herrero-Beaumont, E. Gómez-Barrena, **J. Andrés** and R. Largo. “Osteoarthritis leads to increased levels of protein O-Linked N-Acetylglucosamine in the cartilage”. *OARSI, World Congress on Osteoarthritis*. Brussels, September 2010.